

DOCA 食塩高血圧ラットにおける neutral endopeptidase 24.11 阻害剤の腎作用の機序に関する研究

岩田 至博 島本 和明 浦 信行

札幌医科大学医学部内科学第2講座 (主任 飯村 攻 教授)

The mechanisms of the renal effects of neutral endopeptidase
24.11 inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats

Michihiro IWATA, Kazuaki SHIMAMOTO and Nobuyuki URA

Second Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. O. IIMURA)

ABSTRACT Neutral endopeptidase 24.11 (NEP) degrades both kinin and atrial natriuretic peptide (ANP) *in vitro*. We have reported that the administration of the NEP inhibitor UK73967 (UK) increases urinary kinin, urine volume (UV) and urinary sodium excretion (UNaV), but does not affect plasma ANP level in normotensive rats. In addition, the kinin receptor antagonist Hoe140 (Hoe) clearly canceled the increases of UV and UNaV produced by UK. Therefore, we thought that the renal effects of NEP inhibitor could mainly depend on the suppression of kinin metabolism in normotensive rats. Some reports have suggested, however, that the renal effects of NEP inhibitor might act through inhibition of the ANP metabolism. In this study, we employed UK with or without Hoe and evaluated the renal kallikrein-kinin system and plasma ANP in deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA-salt) hypertensive rats in an attempt to further elucidate the mechanisms of the diuretic and natriuretic effects of NEP inhibition.

Twenty-nine DOCA-salt hypertensive rats were employed. All rats were anesthetized with sodium pentobarbital, and polyethylene tubes were cannulated into the trachea, bladder, femoral artery and femoral vein. After the control period, the rats were divided into the control group (n=9), UK group (UK 10 mg/kg, i. v., n=10) and UK+Hoe group (Hoe 20 nmol/kg, s. c., n=10). Urinary total kininase, NEP, cGMP, UV and UNaV were determined before and after injection of each reagent, and plasma ANP was measured at the end of the protocol in each group.

UK injection decreased total kininase and NEP activities, while vehicle injection did not change any of the parameters. Plasma ANP was significantly higher in the UK group than in the control group. With injection of UK, UV, UNaV and urinary cGMP increased significantly. There were significant positive correlations between plasma ANP level and the change in urinary cGMP, and between the change in urinary cGMP and the change in UV or UNaV in the control and UK groups. Simultaneous administration of Hoe showed no effect on the increases of UV and UNaV induced by UK.

In conclusion, it was suggested that diuretic and natriuretic effects of NEP inhibitor are mainly due to the suppression of ANP metabolism in DOCA-salt hypertensive rats, while previous results from our laboratory have shown those effects are mainly due to the suppression of kinin metabolism in normotensive rats. Thus, the main mechanism of renal effects of NEP inhibition should be considered to be different between normotensive rats and DOCA-salt hypertensive rats.

(Received August 21, 1995 and accepted October 6, 1995)

Key words: Renal kallikrein-kinin system, Neutral endopeptidase inhibitor, Atrial natriuretic peptide, Kinin receptor antagonist, DOCA-salt hypertensive rats

1 緒 言

腎 kallikrein-kinin 系は、腎における水・Na 代謝の調節を介して、各種高血圧症の病態形成に関与することが知られている¹⁻⁴⁾。腎 kallikrein-kinin 系の評価については、従来、kinin の産生酵素である kallikrein が主に検索されてきた。一方、kinin の分解系である腎 kininases も腎 kinin の調節に重要な役割を果たすことが次第に明らかとなり、腎 kininases の本系活性調節に与る役割が注目を集めつつある。これまで知られてきた kininase I (carboxypeptidase M) や kininase II (angiotensin converting enzyme) に加えて、最近では neutral endopeptidase 24.11 (NEP) も kinin 分解能を有することが報告されている⁵⁾。NEP は、ラット⁶⁾、ヒト⁷⁾ 尿において、総 kininase 活性の過半を占め、また、本態性高血圧症、原発性アルドステロン症、クッシング症候群のいずれの高血圧患者においても、正常血圧者に比して、尿中 NEP 活性が亢進していることが明らかとなり⁸⁾、NEP の腎 kinin 代謝における役割がいつそう注目されるようになってきた。そして、近年、NEP 阻害剤が次々と開発され、我々も、特異的 NEP 阻害剤である UK73967⁹⁾ を正常血圧ラットに投与すると、尿中 kinin 排泄量の増加とともに、水・Na 利尿が促進されることを見出した¹⁰⁾。しかも、この水・Na 利尿作用が kinin 受容体拮抗剤で明らかに抑制されることから、少なくとも正常血圧ラットでは、NEP 阻害剤の腎作用が主に腎 kinin 分解の抑制に基づく可能性を報告した¹⁰⁾。

一方、心房性 Na 利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP) も、水・Na 代謝や血圧調節に重要な役割を示すことが知られている^{11,12)}。ANP の代謝は、一つには ANP のクリアランス受容体による¹³⁾ が、他方では NEP が ANP を分解し、これを不活化する¹⁴⁾。そして、spontaneously hypertensive rat (SHR) や deoxycorticosterone acetate (DOCA) 食塩高血圧ラットに NEP 阻害剤を投与すると、血漿 ANP の増大と同時に Na 利尿を認めることから、NEP 阻害剤の腎作用が ANP 代謝抑制に基づくとの報告^{15,16)} を一部にみる。しかしながら、NEP 阻害剤の作用機序を、腎 kallikrein-kinin 系と ANP の両面から同時に評価した

成績^{10,15,17)} は極めて少なく、いずれが主体をなすかについては今なお一致した見解が得られていない。

そこで、本研究では、NEP 阻害剤、UK73967 を DOCA 食塩高血圧ラットに投与し、その際の水・Na 利尿効果と腎 kallikrein-kinin 系諸因子、血漿 ANP 濃度、尿中 cGMP 濃度の変動を同時に追跡した。さらに、kinin 受容体拮抗剤 Hoe140 を併用し、kinin 動態と ANP 動態の両面から詳細に検討し、DOCA 食塩高血圧ラットにおける、NEP 阻害剤の腎作用の機序解明を試みた。

2 実験材料ならびに実験方法

2.1 実験材料

5-6 週令の雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 140-160 g) 32 匹を対象として、100 mg の deoxycorticosterone acetate (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) を medical grade erastomer (MDX4-4210; Dow Corning, Midland, Mich) に溶解して作製したペレットを皮下に植え込み、その後 3 週間 1% 食塩水を摂取させた。この間、当初対象とした 32 匹中の 2 匹が tail-cuff 法による血圧測定時のストレス、およびその際の加温ストレスによると思われる脳血管障害のため死亡、1 匹はペレットが皮下から脱落したためこれを除き、残りの 29 匹について、収縮期血圧が 150 mmHg 以上に上昇していることを確認した上で、その後も 1% 食塩水の摂取を継続させ、1 週間以内に後述の実験操作を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 NEP 阻害剤投与実験

ラットを sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) 50 mg/kg の腹腔内投与、次いで 0.2 mg/kg/min の静脈内持続投与により麻酔し、実験の全経過は体温保持のために 37°C に加温された heating pad 上で行った。

次に、polyethylene tube (Clay Adams, Division of Becton Dickinson and Company, Parsippany, NJ) を気管 (PE-240)、大腿動脈 (PE-50)、大腿静脈 (PE-50)、膀胱 (PE-90) 内にそれぞれ挿入し、呼吸は自発呼吸とした。血圧・心拍数測定、および採血には大腿動脈を、また、sodium pentobarbital、生理食塩

水および UK73967 (UK; Pfizer Central Research, Sandwich, Kent) の投与には大腿静脈を用いた。

以上の手術操作後のプロトコルを Fig. 1 に示す。体重の 5% の生理食塩水 (20 ml/hr) の初期負荷に引き続き、90 分間の安定期を置いた後に、60 分間の対照期とそれに続く 60 分間の実験期を設け、安定期の開始時より実験期の終了時まで 6 ml/hr の生理食塩水を大腿静脈内に持続投与した。さらに実験期の開始時に、control 群 (n=9) では生理食塩水 (1 ml/kg, i. v. と 0.5 ml/kg, s. c.) を、UK 群 (n=10) では 10 mg/ml となるように生理食塩水で調整した UK 溶液 (1 ml/kg, i. v.) と生理食塩水 (0.5 ml/kg, s. c.) をそれぞれ投与し、投与前後各々 60 分間の尿を水中に設置した polypropylene tube に採取した。採取した尿について、尿量、尿中 Na 排泄量、尿中総 kininase 活性、尿中 NEP 活性および尿中 cGMP 排泄量を測定した。さらに実験終了時に採血を行い、ヘマトクリット (Ht) と血漿 ANP 濃度の測定に供した。

2.2.2 NEP 阻害剤の水・Na 利尿作用に及ぼす kinin 受容体拮抗剤の影響の検討

NEP 阻害剤の水・Na 利尿作用と、これへの kinin の関与をさらに詳細に検討するために、実験期の始めに UK (10 mg/kg, i. v.) に加え、Hoe140 (Hoe; 20 nmol/kg, s. c., Department of Pharma Synthesis, Hoechst AG, Frankfurt) を同時投与した UK+Hoe 群 (n=10) を設け、kinin 作用抑制の効果を同様のプロトコルで検討した。なお、Hoe は生理食塩水で 40 nmol/ml に調整して用いた。

2.2.3 測定法

2.2.3.1 尿中総 kininase および NEP 活性

尿中総 kininase 活性は、Sephadex G-25 fine (Pharmacia LKB, Biotechnology AB, Uppsala) column で脱塩した尿試料を用い、合成 bradykinin (ペプチド研究所, 大阪) の分解能として測定した¹⁸⁾。NEP 活性は、NEP の特異的阻害剤である phosphoramidon (1 μM, ペプチド研究所, 大阪) を加えた尿試料と、この阻害剤非使用時の bradykinin 分解能の差を用いて測定した⁶⁾。また、NEP 以外の尿中 kininases 活性を non-NEP 活性とし、総 kininase 活性から NEP 活性を差し引いて求めた。

2.2.3.2 尿中 cGMP

尿中 cGMP は市販のキット (Cyclic GMP assay kit, ヤマサ醤油株式会社, 銚子) により、radioimmunoassay (RIA) 法で測定した。

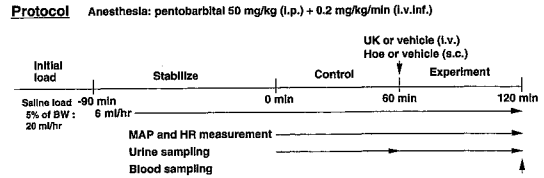


Fig. 1 Protocol of the experiment. Deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA-salt) hypertensive rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i. p. and 0.2 mg/kg/min, i. v. inf.) and placed on a heating pad at 37°C. Polyethylene tubes were placed into the trachea (PE-240), femoral artery (PE-50; blood pressure and heart rate monitoring, blood sampling), femoral vein (PE-50; test solutions and pentobarbital administration), and bladder (PE-90). After a 60 min control period, UK73967 (UK; 10 mg/kg, i. v.) and normal saline (0.5 ml/kg, s. c.) were injected in UK group rats, UK and Hoe140 (Hoe; 20 nmol/kg, s. c.) in UK+Hoe group rats, and normal saline (1 ml/kg, i. v. and 0.5 ml/kg, s. c.) in control group rats. i. p.: intraperitoneal injection; i. v.: intravenous injection; i. v. inf.: intravenous infusion; s. c.: subcutaneous injection.

2.2.3.3 血漿 ANP 濃度

血液試料 (全血 5 ml) を EDTA (1 mg/血液 1 ml), aprotinin (500 KIU/血液 1 ml) が入ったチューブに採取し、冷却遠心器にて血漿を分離した。血漿からの ANP 抽出には Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Millipore Corporation, Milford, MA) を用い、血漿 ANP 濃度は市販のキット [α -ATRIAL NATRIURETIC FACTOR (α -ANF) (RAT) RIA KIT, Peninsula Laboratory, Inc., Belmont, CA] を用いた RIA 法で測定した。

2.2.3.4 血圧および心拍数

血圧および心拍数の測定には、ディスプレイザブル血圧トランスデューサ model DX-360 (日本光電工業, 東京) およびポリグラフ動物実験システム RM6100 (日本光電工業, 東京) を用いた。

また、DOCA および食塩投与後の血圧上昇確認のためには、非観血的なラット尾動脈脈拍測定装置 (夏目製作所, 東京) を用いて収縮期血圧を測定した。

2.2.3.5 その他の計測法

Ht は、HEMATOCRIT KH-1200M 遠心機 (久保田製作所, 東京) を用い、また、尿中 Na 濃度は ion electrode 法 (島津クリニカルイオンメーター CIM-104A 型, 島津製作所, 京都) により測定した。

2・2・4 統計学的検討

計測値はすべて平均±標準誤差 (mean±SEM) で表した。2群間の統計学的有意差の検討で, pairedまたは unpaired data に対しては Student の t 検定を, 3群間の有意差には one way analysis of variance (ANOVA) をそれぞれ用いた。また, 相関係数の計測には linear regression analysis を用い, いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

3 結 果

3・1 NEP 阻害剤の効果

3・1・1 尿量および尿中 Na 排泄量に及ぼす効果

Vehicle あるいは UK 投与前後の尿量および尿中 Na 排泄量を Fig. 2 に示す。UK 群の尿量は対照期の $252 \pm 22 \mu\text{l}/\text{kg}/\text{min}$ から, 実験期に $340 \pm 31 \mu\text{l}/\text{kg}/\text{min}$ と有意 ($p < 0.01$) に増え, また, 尿中 Na 排泄量も対照期の $44 \pm 4 \mu\text{Eq}/\text{kg}/\text{min}$ に比して, 実験期が $58 \pm 5 \mu\text{Eq}/\text{kg}/\text{min}$ と有意 ($p < 0.01$) な高値となった。一方, control 群の尿量, 尿中 Na 排泄量は各々, 対照期は $257 \pm 30 \mu\text{l}/\text{kg}/\text{min}$, $46 \pm 5 \mu\text{Eq}/\text{kg}/\text{min}$, 実験期は $229 \pm 20 \mu\text{l}/\text{kg}/\text{min}$, $40 \pm 3 \mu\text{Eq}/\text{kg}/\text{min}$ と, 尿量に有意な変化はなく, 尿中 Na 排泄量は対照期に比して実験期が有意 ($p < 0.05$) な低値となった。そして, 実験期における尿量および尿中 Na 排泄量はいずれも, UK 群が control 群に比して有意 ($p < 0.01$) に高値であった。

3・1・2 尿中総 kininase 活性, 尿中 NEP 活性および尿中 non-NEP 活性に及ぼす効果

Control 群および UK 群における NEP 阻害剤投与時の尿中総 kininase 活性, 尿中 NEP 活性および尿中 non-NEP 活性を Fig. 3 に示す。まず, 対照期における各々の値には control 群と UK 群との間で有意な差は認めなかった。UK 群の実験期尿中総 kininase 活性は $124 \pm 9 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, 尿中 NEP 活性は $10 \pm 2 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$ と対照期の $246 \pm 13 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, $129 \pm 8 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$ に比していずれも有意 ($p < 0.01$) な低値であった。一方, UK 群における尿中 non-NEP 活性は, 対照期が $116 \pm 12 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, 実験期が $115 \pm 10 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$ と両者間に差を認めなかった。

他方, control 群では vehicle 投与後の尿中総 kininase 活性, 尿中 NEP 活性および尿中 non-NEP 活性は, それぞれ, $240 \pm 11 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, $128 \pm 9 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, $113 \pm 10 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$ と, 投与前の $229 \pm 13 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, $129 \pm 7 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$, $110 \pm 9 \text{ ng}/\text{kg}/\text{min}$ に比していずれも有意な差を認めなかった。以上の

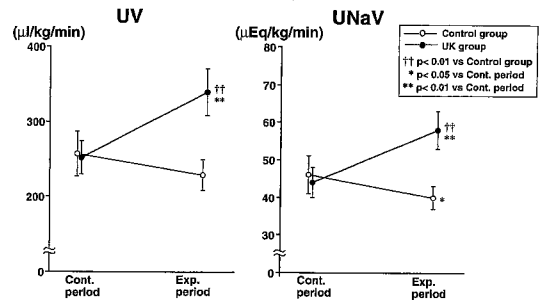


Fig. 2 Urine volume (UV) and urinary sodium excretion (UNaV) before and after a bolus injection of UK73967 (UK; 10 mg/kg, i. v., n=10) or vehicle (n=9). Values are shown as mean±SEM.

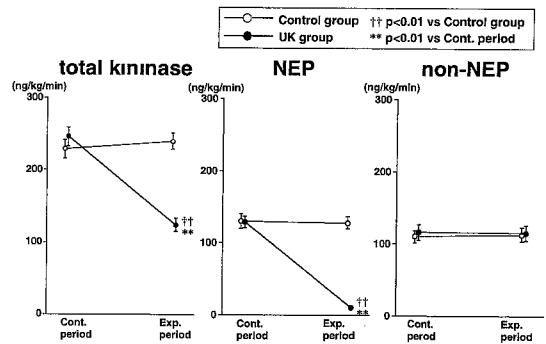


Fig. 3 Urinary excretion of total kininase, NEP and non-NEP before and after a bolus injection of UK73967 (UK; 10 mg/kg, i. v., n=10) or vehicle (n=9). Values are shown as mean±SEM.

結果, UK 群の実験期尿中総 kininase 活性, 尿中 NEP 活性は control 群のそれらに比してともに有意 ($p < 0.01$) な低値を示した。なお, 尿中 kinin 排泄量に関しては, 両群のほとんどの例で軽度ではあるが血尿を示したため, kinin の測定に適さないと考え, 検討項目より除外した。

3・1・3 血漿 ANP 濃度に及ぼす効果

Control 群および UK 群の実験終了時における血漿 ANP 濃度を Fig. 4 に示す。UK 群の血漿 ANP 濃度は $185 \pm 43 \text{ pg}/\text{ml}$ であり, control 群の $98 \pm 15 \text{ pg}/\text{ml}$ に比して有意 ($p < 0.05$) に高値であった。なお, Ht 値は control 群が $45 \pm 2\%$, UK 群は $41 \pm 1\%$ と有意な差は認められなかった。

3・1・4 尿中 cGMP 排泄量に及ぼす効果

Vehicle あるいは UK 投与前後の尿中 cGMP 排泄量

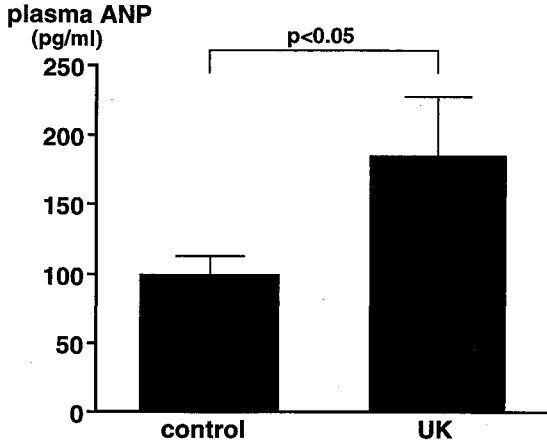


Fig. 4 Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) level after a bolus injection of UK73967 (UK; 10 mg/kg, i. v., n=10) or vehicle (n=9). Values are shown as mean ± SEM.

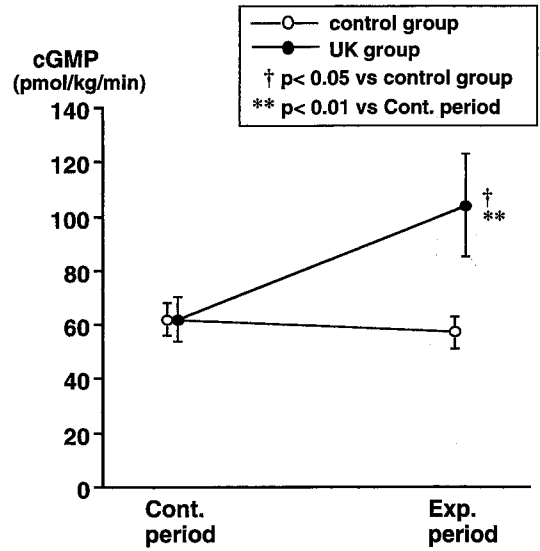


Fig. 5 Urinary cGMP excretion before and after a bolus injection of UK73967 (UK; 10 mg/kg, i. v., n=10) or vehicle (n=9). Values are shown as mean ± SEM.

の変化を Fig. 5 に示す。UK 群における、対照期の尿中 cGMP 排泄量は 62 ± 8 pmol/kg/min であり、実験期には 104 ± 19 pmol/kg/min と有意 ($p < 0.01$) に増加した。一方、control 群の尿中 cGMP 排泄量は、vehicle 投与前後がそれぞれ、 62 ± 6 pmol/kg/min, 57 ± 6 pmol/kg/min と有意な変動を認めなかった。そして UK 群の実験期の尿中 cGMP 排泄量は control 群のそれに比して有意 ($p < 0.05$) に高値であった。

3.1.5 血漿 ANP 濃度と尿中 cGMP 排泄の変化量との相関

Control 群と UK 群を一括し、両者の血漿 ANP 濃度と NEP 阻害剤投与前後の尿中 cGMP 排泄の変化量 (Δ cGMP) との相関を Fig. 6 に示す。血漿 ANP 濃度と Δ cGMP との間には有意な正の相関 ($r = 0.793$, $p < 0.01$) が認められた。

3.1.6 尿中 cGMP 排泄の変化量と、尿量・尿中 Na 排泄の変化量との相関

Control 群と UK 群を一括し、薬剤投与前後の Δ cGMP と尿量の変化量 (Δ UV) との相関を Fig. 7 左に、 Δ cGMP と尿中 Na 排泄の変化量 (Δ UNaV) との相関を Fig. 7 右に示す。 Δ cGMP と Δ UV ($r = 0.455$, $p < 0.05$) および Δ cGMP と Δ UNaV の間 ($r = 0.507$, $p < 0.05$) にはいずれも有意な正の相関が認められた。

3.2 NEP 阻害剤の水・Na 利尿効果に及ぼす kinin 受容体拮抗剤の影響

NEP 阻害剤と同時に kinin 受容体拮抗剤を投与した UK+Hoe 群の尿量は、対照期の 249 ± 33 μ l/kg/min

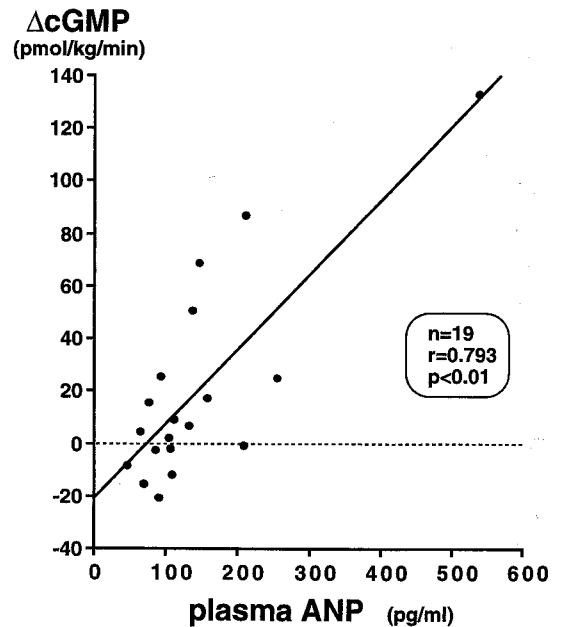


Fig. 6 Correlation between plasma atrial natriuretic peptide (ANP) levels and the changes in urinary cGMP excretion (Δ cGMP) in UK73967 and vehicle treated rats (n=19).

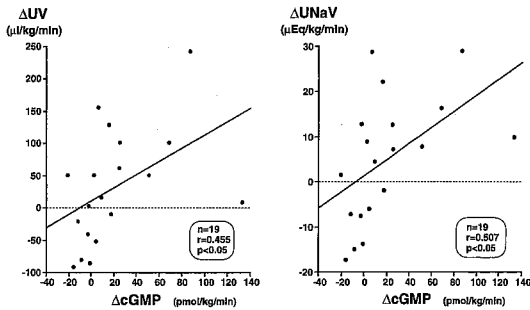


Fig. 7 Correlations between the changes in urinary cGMP excretion (Δ cGMP) and those in urine volume (Δ UV) (left panel), or urinary sodium excretion (Δ UNaV) (right panel) in UK73967 and vehicle treated rats ($n=19$).

から、実験期に $295 \pm 29 \mu\text{l/kg/min}$ と有意 ($p < 0.05$) に増え、また、尿中 Na 排泄量も対照期の $37 \pm 4 \mu\text{Eq/kg/min}$ に比して、実験期が $44 \pm 3 \mu\text{Eq/kg/min}$ と有意 ($p < 0.05$) な高値となった。そこで、control 群、UK 群および UK+Hoe 群の 3 群における Δ UV と Δ UNaV を比較し、その結果を Fig. 8 左右に示した。 Δ UV は、control 群が $-30 \pm 19 \mu\text{l/kg/min}$ 、UK 群は $84 \pm 25 \mu\text{l/kg/min}$ 、UK+Hoe 群は $46 \pm 19 \mu\text{l/kg/min}$ となり、UK 群は control 群に比して有意 ($p < 0.01$) に大であり、また、UK+Hoe 群も control 群に比して有意 ($p < 0.05$) に大であった。しかし、UK 群と UK+Hoe 群との間では後者が低値とはなったが、有意差には至らなかった。 Δ UNaV も、control 群が $-5.8 \pm 3.0 \mu\text{Eq/kg/min}$ 、UK 群は $14.5 \pm 3.1 \mu\text{Eq/kg/min}$ 、UK+Hoe 群は $7.9 \pm 2.5 \mu\text{Eq/kg/min}$ となり、UK 群、UK+Hoe 群ともに control 群に比して有意 ($p < 0.01$) に大であったが、UK 群と UK+Hoe 群との間に有意差は認められなかった。

3.3 血圧と心拍数の変化

Control 群、UK 群および UK+Hoe 群における平均血圧の変化を Fig. 9 左に、心拍数の変化を Fig. 9 右に示す。対照期の平均血圧は、control 群 $131 \pm 6 \text{ mmHg}$ 、UK 群 $131 \pm 6 \text{ mmHg}$ 、UK+Hoe 群 $139 \pm 3 \text{ mmHg}$ 、実験期のそれぞれは、 $125 \pm 5 \text{ mmHg}$ 、 $124 \pm 6 \text{ mmHg}$ 、 $131 \pm 4 \text{ mmHg}$ と、対照期に比して実験期の平均血圧は control 群 ($p < 0.01$)、UK 群 ($p < 0.05$)、UK+Hoe 群 ($p < 0.01$) いずれにおいても有意に低値であったが、対照期、実験期ともに 3 群間での差は認められなかった。また、心拍数は対照期が各々 $346 \pm 15 \text{ beats/min}$ 、 $325 \pm 21 \text{ beats/min}$ 、 354 ± 18

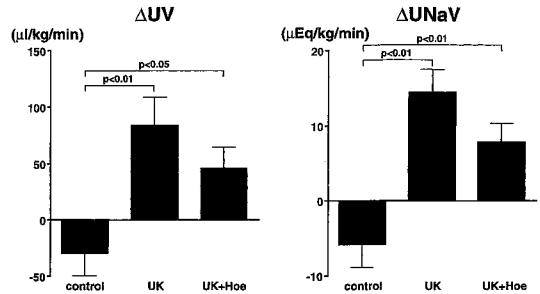


Fig. 8 Changes in urine volume (Δ UV) and urinary sodium excretion (Δ UNaV) in rats treated with UK73967 (UK; 10 mg/kg , i. v., $n=10$), Hoe140 (Hoe: kinin receptor antagonist, 20 nmol/kg , s. c.) in combination with UK (UK+Hoe, $n=10$), or vehicle ($n=9$). Values are shown as mean changes from those during the control period.

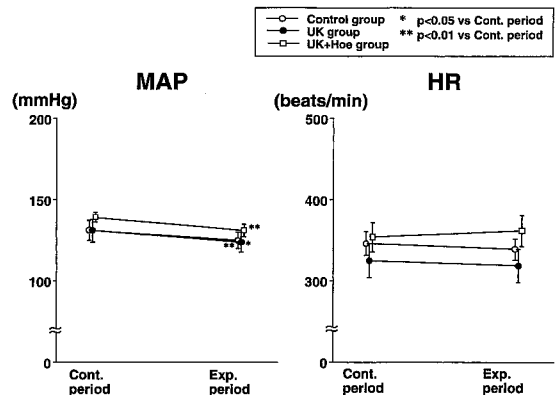


Fig. 9 Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) before and after a bolus injection of UK73967 (UK; 10 mg/kg , i. v., $n=10$), Hoe140 (20 nmol/kg , s. c.) in combination with UK (UK+Hoe, $n=10$), or vehicle ($n=9$). Values are shown as mean \pm SEM.

beats/min 、実験期が各々 $339 \pm 13 \text{ beats/min}$ 、 $325 \pm 21 \text{ beats/min}$ 、 $362 \pm 19 \text{ beats/min}$ となり、3 群とも薬剤投与による有意な変動はなく、同時に 3 群間の差も認めなかった。

4 考 察

NEP は、*in vitro* で、kinin, ANP, enkephalin, endorphin, substance P や angiotensin(s) などの種々の peptide を代謝することが知られており、NEP により kinin は主に $\text{Pro}^7\text{-Phe}^8$ 結合で、ANP は主に $\text{Cys}^7\text{-$

Phe⁸ 結合で切断・不活化される。我々は既に、正常血圧ラットへの NEP 阻害剤投与が、血漿 ANP 濃度の変化を伴わずに、尿中総 kininase, NEP 活性の低下と尿中 kinin 排泄量, 尿量, 尿中 Na 排泄量を増大させることを見出した¹⁰⁾。しかも, kinin 受容体拮抗剤 Hoe140 (D-Arg [Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸] bradykinin) を同時投与すると, NEP 阻害剤の水・Na 利尿作用が消失することから, 少なくとも正常血圧ラットでは, NEP 阻害剤の腎作用が主に腎における kinin 分解の抑制に基づく可能性を報告した¹⁰⁾。また, Smits *et al.*¹⁷⁾ は, 正常血圧ラットにおいては NEP 阻害剤による血漿 ANP 濃度の明らかな増大はなく, その水・Na 利尿作用は kinin 受容体拮抗剤 (D-Arg [Hyp³, Thi⁵, D-Phe⁷, Thi⁸] bradykinin) で完全に抑制されたと報告しており, この報告は我々の正常血圧ラットにおける既報の成績と軌を一にするものである。

一方, NEP 阻害剤の腎作用が ANP 代謝阻害に基づく可能性も少なからず報告されている。Hirata *et al.*¹⁵⁾ は, NEP 阻害剤である thiorphan を SHR および Wister-Kyoto ラット (WKY) に投与し, SHR, WKY のいずれにおいても血漿及び尿中 ANP 濃度の増大と, 尿中 Na 排泄量の増加を認め, この Na 利尿が ANP 抗血清の前投与により著明に減弱し, kinin 受容体拮抗剤である D-Arg [Hyp³, Thi⁵, D-Phe⁷, Thi⁸] bradykinin では影響されなかったと述べている。また, Shepperson *et al.*¹⁶⁾ も急性容量負荷ラットと DOCA 食塩高血圧ラットでほぼ同様の成績を報告し, 他にも, Dahl 食塩感受性ラット, 5/6 腎摘ラットなどにおいて同様の報告がなされている。このように, NEP 阻害剤の水・Na 利尿作用の機序に関わる腎 kinin と血漿 ANP の役割が, 正常血圧ラットと DOCA 食塩高血圧ラットなどの実験的高血圧モデルで異なる可能性も推測されるが, それぞれがどのように寄与するかは, 今も結論が得られていないのが現状である。

そこで本研究では, 従来の NEP 阻害剤よりもさらに特異性の高い UK73967 (UK)^{9,10)} を DOCA 食塩高血圧ラットに投与し, その効果を検討した。その結果, DOCA 食塩高血圧ラットでは, UK 投与により尿中 non-NEP 活性の変化を伴わずに尿中総 kininase 活性, NEP 活性は有意に低下し, また, 尿量, 尿中 Na 排泄量は増加した。これらは, 既に報告した正常血圧ラットにおける NEP 阻害剤投与の効果¹⁰⁾ と同様であった。

本研究では, 血漿 ANP 測定は採血による循環血液量の変動を考慮して実験終了時のみとしたため, UK 投与前後での変動は計測し得なかったが, DOCA 食塩高

血圧ラットにおける UK 群の実験終了時の血漿 ANP 濃度は control 群に比して有意に高値であった。そこで, ANP の second messenger である cGMP を測定したところ, UK 投与により尿中 cGMP 排泄量は有意に増加した。この際の尿中 cGMP 排泄の変化量は血漿 ANP 濃度と良好な正の相関を示し, かつ, 尿量及び尿中 Na 排泄の変化量がともに尿中 cGMP 排泄の変化量と正の相関を示した。以上の成績は, DOCA 食塩高血圧ラットでは, UK の水・Na 利尿促進効果が主に血漿 ANP 代謝抑制に基づくことを示唆するものと考えられた。この成績は, NEP 阻害剤投与で血漿 ANP 濃度が増加しなかった我々の正常血圧ラットにおける既報の報告¹⁰⁾ とは明らかに異なる結果となった。ANP の代謝には, ANP のクリアランス受容体による代謝と NEP による分解の 2 経路が明らかとなっており^{13,14)}, 正常血圧下では, クリアランス受容体による ANP 代謝が NEP による代謝よりも優位にあると報告されている^{19,20)}。しかし, DOCA 食塩高血圧ラットのような高血圧状態や体液量が増大した状態では, 血漿 ANP 濃度が増加することから, 正常血圧ラットに比して血漿 ANP 濃度が高くなった結果, ANP のクリアランス受容体による down regulation を生じた可能性は十分に推測し得る。その結果として, 少なくとも DOCA 食塩高血圧ラットでは, ANP 代謝における NEP の寄与がクリアランス受容体によるものよりも相対的に増大し, NEP 阻害が ANP 増大をもたらしたものと考えられる。

一方, DOCA 食塩高血圧ラットにおいては, UK の水・Na 利尿効果は, kinin 受容体拮抗剤 Hoe の同時投与で有意な影響は受けなかった。このことも, 正常血圧ラットでの UK による水・Na 利尿効果が kinin 受容体拮抗剤 Hoe の同時投与により消失した我々の既報の成績¹⁰⁾ とは明らかに異なった。本研究では, 尿試料が軽度ながらも血尿を示したため, 尿中 kinin 排泄量は測定し得なかったが, DOCA 食塩高血圧ラットにおける UK の NEP 活性抑制効果は, 正常血圧ラットにおけるそれと同等であったことから, 腎 kinin は同様に亢進していたことが推測される。従って, 増大した ANP による腎水・Na 利尿作用が, kinin による同様の作用を相対的に凌駕した結果, このように実験動物モデル間で成績の解離が生じたものと考えた。

以上の成績から, 正常血圧ラットにおける NEP 阻害剤の腎水・Na 利尿促進作用が主として kinin 増大に基づく¹²⁾ のとは異なり, DOCA 食塩高血圧ラットにおけるそれはむしろ ANP 代謝の抑制に基づくものが主体である可能性が示唆された。従って, NEP 阻害剤の腎作

用に対する腎 kallikrein-kinin 系および血漿 ANP の寄与は、実験動物モデルによって異なるものと推測され、高血圧症の病態を考慮する上で極めて興味深い知見と考えられた。

NEP 阻害剤の降圧効果は、正常血圧ラットではいずれの報告でも明らかでない^{6,17)}。他方、各種の高血圧ラットにおける降圧効果については一定の見解が得られていないが^{15,16,21,22)}、DOCA 食塩高血圧ラットでは降圧を認めるとする報告^{16,21,22)}が多数を占める。本研究では、control 群、UK 群、UK+Hoe 群全ての実験期で同程度に軽度ながらも有意な降圧を認め、また、実験期の血圧には3群間で差違を認めなかった。すなわち、DOCA 食塩高血圧ラットでは、UK が血漿 ANP を増大させたにも関わらず降圧作用を示さず、従来の報告とは異なった結果となった。本研究では、正確な採尿を期して膀胱カテーテルを挿入すべく、実験を麻酔下で行った。その結果、ANP の降圧作用が顕性化しなかった可能性も考えられ、降圧作用自体の評価には、覚醒下での研究が必須と思われた。

なお、ヒトにおいても尿中 NEP 活性は尿中総 kininase 活性の58%を占め、本態性高血圧症、原発性アルドステロン症、クッシング症候群などの各種高血圧患者ではこの NEP 活性の一層の亢進が認められている。他方、NEP 阻害剤はヒト^{23,24)}においても、水・Na 利尿作用を示すことが報告されており、さらに最近では NEP 阻害剤が本態性高血圧患者において降圧効果を示すとする報告^{25,26)}もなされるようになった。降圧薬、利尿薬としての NEP 阻害剤の臨床応用も期待されるが、今後の課題として残されている。

5 結 語

NEP 阻害剤の腎水・Na 排泄促進の機序における腎 kinin、血漿 ANP の役割を解明するため、DOCA 食塩高血圧ラットに NEP 阻害剤 UK73967 を投与し、諸量の変動を検討した。さらに、UK73967 に加え、kinin 受容体拮抗剤の Hoe140 を同時投与し、NEP 阻害剤投与時の kinin 抑制効果を検討し、以下の成績を得た。

1. UK73967 投与により尿量、尿中 Na 排泄量は増加した。

2. UK73967 投与により尿中総 kininase 活性、NEP 活性は抑制され、尿中 non-NEP 活性は不変であった。

3. 血漿 ANP 濃度は、control 群に比して UK73967 投与群では有意に高値であった。

4. UK73967 投与により尿中 cGMP 排泄量は増加し

た。

5. 実験終了時点の血漿 ANP 濃度と尿中 cGMP 排泄の変化量との間に有意な正の相関を認め、かつ、尿中 cGMP 排泄の変化量と尿量および尿中 Na 排泄の変化量との間にも有意な正の相関を認めた。

6. Hoe140 の同時投与は、UK73967 投与の際の尿量、尿中 Na 排泄量の増加には明らかな影響を及ぼさなかった。

以上より、DOCA 食塩高血圧ラットにおける UK73967 の水・Na 利尿効果は、主として ANP 代謝抑制に基づくものである可能性が大ききく、NEP 阻害剤の腎作用が腎 kinin 代謝抑制による正常血圧ラットにおける既報の成績と異なった結果を得た。従って、NEP 阻害剤の腎作用の主たる機序は、実験動物モデルつまり病態によって大きく相違するものと推測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なご指導を頂いた飯村攻教授ならびに本研究にご協力頂いた教職員各位に深く感謝いたします。

参 考 文 献

1. Tomiyama H, Scicli AG, Scicli GM, Carretero OA. Renal effects of Fab fragment of kinin antibodies on deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension* 1990, 15: 761-766.
2. Shimamoto K, Ura N, Nakao T, Mita T, Kondo M, Ando T, Tanaka S, Iimura O. Role of the kallikrein-kinin system in sodium metabolism in normotensives and essential hypertensives. *NZ Med J* 1983, 96: 905-907.
3. Margolius HS, Geller R, Pisano JJ, Sjoerdsma A. Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension. *Lancet* 1971, ii: 1063-1065.
4. Iimura O, Shimamoto K, Ura N, Nakagawa M, Nishimiya T, Ando T, Yamaguchi Y, Masuda A, Ogata H, Saito S, Yamaji I, Fukuyama S. The pathophysiological role of renal dopamine, kallikrein-kinin and prostaglandin system in essential hypertension. *Agents Actions* 1987, 22: 247-256.
5. Mumford RA, Pierzchala PA, Strauss AW, Zimmerman M. Purification of a membrane-bound metalloendopeptidase from porcine kidney that degrades peptide hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78: 6623-6627.

6. Ura N, Carretero OA, Erdős EG. Role of renal endopeptidase 24.11 in kinin metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int* 1987, 32: 507-513.
7. Ogata H, Ura N, Shimamoto K, Sakakibara T, Ando T, Nishimiya T, Masuda A, Ise T, Shiiki M, Uno K, Iimura O. A sensitive method for differential determination of kininase I, II and neutral endopeptidase (NEP) in human urine. *Adv Exp Med Biol* 1989, 247B: 343-348.
8. Ura N, Shimamoto K, Satoh S, Kuroda S, Nomura N, Ohmoto Y, Masuda A, Iimura O. Renal kininase I, kininase II and neutral endopeptidase 24.11 activities in patients with essential hypertension, primary aldosteronism and Cushing's syndrome. *Hypertens Res* 1993, 16: 253-258.
9. Fournie-Zaluski MC, Lucas E, Waksman G, Roques P. Differences in the structural requirements for selective interaction with neutral metalloendopeptidase (enkephalinase) or angiotensin-converting enzyme. *Eur J Biochem* 1984, 139: 267-274.
10. 黒田せつ子, 島本和明, 浦 信行. Neutral endopeptidase 24.11 阻害剤の水・Na利尿作用の機序に関する研究. *札幌医学雑誌* 1994, 63: 11-21.
11. Blaine EH, Seymour AA, Marsh EA, Napier MA. Effects of atrial natriuretic factor on renal function and cyclic GMP production. *Fed Proc* 1986, 45: 2122-2127.
12. Sonnenberg H, Honrath U, Chong CK, Wilson DR. Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1986, 250: F963-F966.
13. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussensweig D, Scarborough RM, McEnroe GA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987, 238: 675-678.
14. Stephenson SL, Kenny AJ. The hydrolysis of alpha human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase 24.11. *Biochem J* 1987, 243: 183-187.
15. Hirata Y, Matsuoka H, Hayakawa H, Sugimoto T, Suzuki E, Sugimoto T, Kangawa K, Matsuo H. Role of endogenous atrial natriuretic peptide in regulating sodium excretion in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1991, 17: 1025-1032.
16. Shepperson NB, Barclay PL, Bennet JA, Samuels GMR. Inhibition of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) leads to an atrial natriuretic factor-mediated natriuretic, diuretic and antihypertensive response in rodents. *Clin Sci* 1991, 80: 265-269.
17. Smits GJ, McGraw DE, Trapani AJ. Interaction of ANP and bradykinin during endopeptidase 24.11 inhibition: renal effects. *Am J Physiol* 1990, 258: F1417-F1424.
18. Ura N, Shimamoto K, Tanaka S, Nishimiya T, Mita T, Nakagawa M, Maeda T, Yamaguchi Y, Iimura O. Urinary excretion of kininase I and kininase II activities in essential hypertension, a sensitive and simple method for its kinin-destroying capacity. *J Clin Hypertens* 1985, 1: 15-22.
19. Chiu PJS, Tetzloff G, Romano MT, Foster CJ, Sybertz EJ. Influence of C-ANF receptor and neutral endopeptidase on pharmacokinetics of ANF in rats. *Am J Physiol* 1991, 18: 798-804.
20. Chevalier RL, Garmey M, Scarborough RM, Lindon J, Gomez RA, Peach MJ, Carey RM. Inhibition of ANP clearance receptors and endopeptidase 24.11 in maturing rats. *Am J Physiol* 1991, 260: R1218-R1228.
21. Seymour AA, Norman JA, Assad MM, Fennell SA, Swerdel JN, Little JK, Dorso CR. Renal and depressor effects of SQ29072, a neutral endopeptidase inhibitor, in conscious hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990, 16: 163-172.
22. Sybertz EJ, Chiu PJS, Vemulapalli S, Watkins R, Haslanger MF. Atrial natriuretic factor-potentiating and antihypertensive activity of SCH 34826. *Hypertension* 1990, 15: 152-161.
23. Gros C, Souque A, Schwartz JC, Duchier J, Cournot A, Baumer P, Lecomte JM. Protection of atrial natriuretic factor against degradation: diuretic and natriuretic responses after *in vivo* inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetorphan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 7580-7584.
24. Richards AM, Crozier IG, Kosoglou T, Rallings M, Espiner EA, Nicholls MG, Yandel TG, Ikram H, Frampton C. Endopeptidase 24.11 inhibition by SCH42495 in essential hypertension. *Hypertension* 1993, 22: 119-126.
25. Lefrancois P, Clerc G, Duchier J, Lim C, Lecomte JM, Gros C, Schwartz JC. Antihypertensive activity of sinorphan. *Lancet* 1990, 336: 307-308.
26. Ogiwara T, Rakugi H, Masuo K, Yu H, Nagano M, Mikami H. Antihypertensive effects of the neutral endopeptidase inhibitor SCH42495

in essential hypertension. Am J Hypertens 1994,
7: 943-947.

別刷請求先：

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第2講座 岩田至博