

## 非麻酔下正常血圧ラットにおける腎 Kallikrein-Kinin 系抑制時の腎水・ナトリウム代謝

斎藤 重幸 島本 和明 Oscar A. CARRETERO\*

札幌医科大学医学部内科学第2講座 (主任 飯村 攻 教授)

\* Henry Ford Hospital, Hypertension & Vascular Research Division

### The Effects of the Suppression of Renal Kallikrein-Kinin System on the Water and Sodium Metabolism in Normotensive Conscious Rats

Shigeyuki SAITOH, Kazuaki SHIMAMOTO and Oscar A. CARRETERO\*

Department of Internal Medicine (Section 2), School of Medicine, Sapporo Medical University

(Chief: Prof. O. IIMURA)

\* Henry Ford Hospital, Hypertension & Vascular Research Division, U. S. A.

**ABSTRACT** Recent findings have suggested that the endogenous renal kallikrein-kinin system acts on the renal water-sodium metabolism at the distal nephron as a paracrine hormone system. The present study was designed to determine the acting site, and secondarily, to evaluate the role of the kallikrein-kinin system on renal hemodynamics and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production. IgG (anti-KAL-IgG) and Fab fragment (anti-KAL-Fab) were isolated from monoclonal antibody against rat glandular kallikrein; both anti-KAL-IgG and anti-KAL-Fab were found to inhibit glandular kallikrein activity *in vitro*. Next, purified IgG (anti-ricin-IgG) and Fab fragment (anti-ricin-Fab) from monoclonal antibody to ricin, which is a vegetable protein and does not exist in mammals, were tested; neither anti-ricin-IgG nor anti-ricin-Fab blocked kallikrein activity *in vitro*. The anti-KAL-Fab were observed to pass through the glomeruli and reach the luminal site of the distal nephron, but anti-KAL-IgG did not pass through the glomerulus. In this study, both anti-KAL-Fab and anti-KAL-IgG were administered to unanesthetized normotensive rats.

When 1.0 mg anti-KAL-Fab was administered, urinary kallikrein activity (kininogenase activity) and the excretion of immunoreactive kinin were significantly decreased ( $-73.4 \pm 4.3\%$  and  $-84.2 \pm 5.3\%$  change from control values, respectively). At the same time, the urine volume and urinary sodium excretion significantly decreased by  $27.0 \pm 7.1\%$  and  $21.4 \pm 6.1\%$ , respectively. In the rats receiving anti-ricin-IgG or anti-ricin-Fab, the renal function revealed no change. Bolus injection of 2.0 mg anti-KAL-Fab caused antidiuretic and antinatriuretic actions without change in GFR, renal blood flow or mean blood pressure. On the other hand, urinary PGE<sub>2</sub> fell by  $39.4 \pm 18.4\%$  following the injection of 2.0 mg anti-KAL-Fab. Anti-ricin-Fab demonstrated no change in any of these parameters. The change in PGE<sub>2</sub> correlated significantly with that of urine volume ( $r=0.73$ ;  $p < 0.001$ ) and urinary sodium excretion ( $r=0.61$ ;  $p < 0.01$ ).

Thus, these findings show that 1) anti-KAL-Fab probably suppresses the renal kallikrein activity in the luminal site of the nephron; 2) inhibition of kinin generation causes decreases in the water and sodium excretions in normotensive conscious rats; 3) these renal changes are not dependent on renal hemodynamic alteration; and 4) luminal kinin partially controls PGE<sub>2</sub> formation in the kidneys.

From these results, it was concluded that kinin on the luminal site of the distal nephron plays a

role in the regulation of water and sodium excretion acting as a paracrine hormone, either directly or via PGE<sub>2</sub>.

(Received February 19, 1993 and accepted March 5, 1993)

**Key words:** Kallikrein-kinin system, Water-sodium metabolism, Prostaglandin E<sub>2</sub>,  
Monoclonal antibody, Fab-fragment

## 1 緒 言

1971年, Margolius *et al.*<sup>1)</sup>が高血圧患者における尿中 kallikrein の排泄低下をはじめて指摘した。以来、腎性降圧系である kallikrein-kinin 系の各種高血圧性疾患、腎疾患における知見が集積され、水・電解質代謝や高血圧の発症・維持に関わる本系の役割が注目を集めるようになった。本系は腎において、① kinin は血管拡張作用を有し腎血行動態の変化を介して、水・電解質代謝に影響を与える<sup>2,3)</sup>、② kinin は直接腎尿細管上皮に働き、ナトリウムなどの電解質輸送に関わる<sup>4)</sup>、③ 腎 kallikrein-kinin 系は renin-angiotensin-aldosterone 系<sup>5)</sup>、atrial natriuretic peptide<sup>6)</sup> や腎の prostaglandin 系<sup>7)</sup>、dopamine 系<sup>8)</sup> などと密接に関連し水・電解質代謝の調整に与る、以上の機転が推測されている。それ故、kallikrein-kinin 系は腎内 paracrine hormone としての多様な生理作用が想定される<sup>9)</sup>。しかしながら、これらに関する研究報告の多くは外因性 kinin の投与実験<sup>10)</sup> や、単離尿細管を用いた *in vitro* の検討<sup>4,11)</sup> であり、少数の *in vivo* の検討でも、抗 kinin 抗体<sup>12)</sup> や aprotinin など kallikrein 阻害物質<sup>13,14)</sup> の投与により、内因性 kinin 作用抑制の結果から類推するものであった。腎内の kinin の作用部位についても、腎尿細管々腔側、血管側、その両者との諸説があり未だ明確な結論が得られていない。つまり、本系作動の生理的効果はともかくとして、その作用機転に関しての詳細は未だ不明と言わざるを得ない状況である。

そこで本研究は、内因性 kallikrein-kinin 系の腎水・ナトリウム (Na) 代謝に対する作用機転をより明らかにする目的で、非麻酔下正常血圧ラットを用い、腎 kallikrein 活性阻害作用を有する、抗 kallikrein-モノクロナール抗体の精製 IgG (以下抗 KAL-IgG) とその Fab-fragment (以下抗 KAL-Fab) の投与を行なった。すなわち、糸球体を通過せず腎尿細管血管側からのみ kallikrein 活性を抑制する抗 KAL-IgG と、糸球体を通過し、腎尿細管の管腔側と血管側の両面から kallikrein 活性を抑制しうる抗 KAL-Fab の投与実験を試みた。そして、その際の水・Na 排泄量の変化を、尿中

kinin 排泄量、尿中 prostaglandin E<sub>2</sub> 排泄量、平均血圧、腎血流量、糸球体濾過率とともに計測し、内因性 kallikrein-kinin 系の腎尿細管に対する作用機転と作用部位を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 実験動物の作製

体重 250-320 g の雄性 Sprague-Dawley ラット (65 匹) を実験用飼育ケージに移し、食餌・飲水の制限なしに 3-4 日間飼育した後、A 群、B 群に分け以下の前処置を行った。A 群のラットは、sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下に腹部正中切開し、覚醒下採尿のための金属カテーテル<sup>18)</sup> を膀胱内に植え込み、固定した。次いで、カテーテルの体外断端を金属ワイヤーで封鎖し、penicillin G 20 万単位を筋肉内投与した後に腹部の切開を縫合閉鎖した。一週間後、体重減少のないラットのみを選び、エーテル吸入麻酔下、大腿動脈および大腿静脈に、ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを挿入した。カテーテルの先端は腹部大動脈と下大静脈に置き、他端は小ワイヤーで封鎖後、ラット後頸部より体外に導き固定した。B 群ラットは、A 群ラットと同様に膀胱カテーテルを留置し、一週間後に再度 sodium pentobarbital (50 mg/kg) の腹腔内麻酔下に、開腹し、左腎動脈周囲に腎血流量測定用の Doppler flow probe<sup>19)</sup> を固定した。Probe の断端は、後頸部より体外へ誘導し、固定した。更に一週間後 A 群ラットと同様の動、静脈カテーテルを挿入固定した。

A、B 群ともカテーテル挿入後 2 日間の回復期を置いた後、体重減少がなく、かつ正常な摂食行動を示したラットを以下の投与実験に供した。なお、投与実験に入る前の 4-5 日間は、連日 3-4 時間ラットを実験用ケージに入れ、投与実験時の環境に適應させた。

### 2.2 抗 KAL-IgG と抗 KAL-Fab の作製

ラット腺性 kallikrein に対するモノクロナール抗体は既報の方法<sup>15)</sup> により作製した。対照実験には植物由来の蛋白である ricin に対するモノクロナール抗体<sup>16)</sup> を用いた。また、各々のモノクロナール抗体から免疫グロブリン (IgG) を affinity-chromatography 法により

分離精製した。更に各精製 IgG を papain で加水分解し、Fab-fragment を affinity-chromatography 法により分離し精製した。以上により得た抗 KAL-IgG、ricin モノクロナール抗体 IgG (抗 ricin-IgG)、抗 KAL-Fab および ricin モノクロナール抗体 Fab-fragment (抗 ricin-Fab) を以下の実験に使用した。

### 2・3 *In vitro* 実験における抗 KAL-IgG と抗 KAL-Fab の kallikrein 活性抑制効果の検討

前項に述べた方法で得た抗 KAL-IgG と抗 KAL-Fab の腺性 kallikrein 活性阻止能を *in vitro* で、kinin 生成能を指標とする kininogenase 法<sup>17)</sup> により検討した。まず、精製 kallikrein を 10 pg 含んだ phosphate-buffered saline (PBS: 0.01 M, pH 7.0) 1.0 ml に、PBS 100  $\mu$ l に溶解した抗 KAL-Fab および抗 KAL-IgG を各々、0.05, 0.5, 5.0, 50.0  $\mu$ g 添加し、10 分間 37°C でインキュベーションした。対照には抗 KAL-Fab あるいは抗 KAL-IgG を加えない試料を用いた。つぎに基質として PBS 100  $\mu$ l に溶解した精製イヌ kininogen<sup>17)</sup> 25  $\mu$ g を加え、更に 30 分間インキュベーションし、4°C 100% ethanol 5.0 ml を加えて反応を停止したのち、産生された kinin を radioimmunoassay (RIA) で測定した。同時に抗 ricin-Fab あるいは抗 ricin-IgG 50.0  $\mu$ g 添加時の kallikrein 活性抑制能を同様の方法で測定した。結果は対照に対する抗 KAL-Fab ならびに抗 KAL-IgG 添加時の kallikrein 活性阻止率として算出した。

### 2・4 *In vivo* における抗 KAL-IgG、抗 KAL-Fab の投与実験

実験当日ラットを実験用ケージに入れ、まず動脈カテーテルより、70  $\mu$ l の採血を行ない、ヘマトクリット値 (Ht) の測定に供した。次いで動脈カテーテルを圧トランスジューサーに接続し、平均血圧を連続記録した。一方、静脈カテーテルを持続注入ポンプに接続して、100  $\mu$ l/min の生理食塩水を持続注入し、この経路を用いて抗 KAL-IgG、抗 KAL-Fab を投与した。また、膀胱カテーテルは、4°C に保った ice bath 中のシリコン化試験管内に導き、持続的に採尿した (Fig. 1A)。B 群ラットでは、更に、背部から Doppler flow probe の断端をトランスジューサーに接続し、持続的に腎血流量を測定した (Fig. 1B)。平均血圧及び腎血流量の測定値は、15 秒毎にコンピューターで集積し、各実験期ごとに平均値を算出した。

なお、実験開始時の Ht が 40% 未満のラット、および実験中に血尿が認められたラットはすべての計測から除外した。

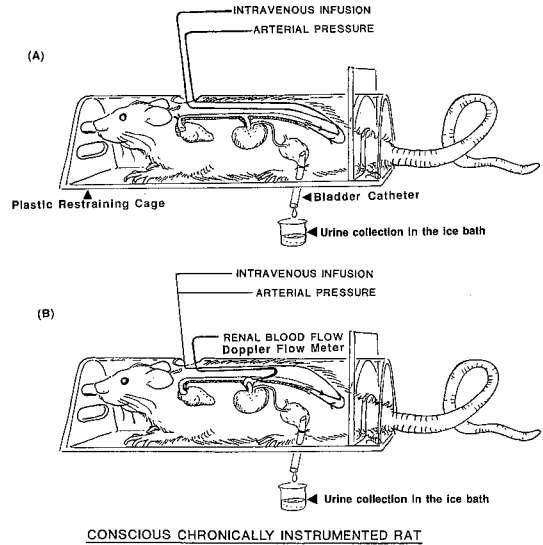


Fig. 1 Surgical preparation. In conscious chronically instrumented rat, the PE-10 tube is placed into both aorta and inferior vena cava, and metal catheter into the bladder (A). In addition, the handmade Doppler flow probe is placed around left renal artery (B).

### 2・4・1 平均血圧、尿量、尿中 Na 排泄量と、腎 kallikrein-kinin 系に対する抗 KAL-IgG、抗 KAL-Fab 投与の影響

本実験のプロトコル(プロトコル 1)を Fig. 2 上段に示す。ここでは、腎 kallikrein 活性に対する抗 KAL-IgG、抗 KAL-Fab 投与の効果とその際の水・Na 排泄への影響を非麻酔下ラットで検討した。上記の A 群ラットに抗 KAL-IgG (n=6) と抗 KAL-Fab (n=9) を投与した。対照には、各々、抗 ricin-IgG (n=6) と抗 ricin-Fab (n=9) を投与し、更に経時的な変動を追跡する対照群として生理食塩水のみ投与群 (time-control 群: n=6) を用いた。実験は、Fig. 2 上段に示す様に、生理食塩水持続投与 (100  $\mu$ l/分) 2 時間後より開始した。計測は IgG、Fab-fragment 投与前の 30 分間 (control-period: cont) と投与後の 30 分間 (experimental-period 1: Exp 1)、ならびに、これに次ぐ 30 分間 (experimental-period 2: Exp 2) の 3 実験期で行なった。すなわち、先に述べた 5 群で、尿量 (UV) と平均血圧 (MBP) 測定を行ない、採尿検体を用いて尿中 kallikrein 活性、尿中 kinin 排泄量、ナトリウム排泄量 (UNaV) を測定した。抗 KAL-IgG 群と抗 ricin-IgG 群では、それぞれの IgG 1.5 mg を 0.5 ml の生理食塩水に溶解し、初回 bolus 投与後、生理食塩水 6.0 ml に溶解したそれぞれの IgG、1.5 mg を Exp 1、

Exp 2を通じて持続注入し、計 3.0 mg の投与を行なった。他方、抗 KAL-Fab 群、抗 ricin-Fab 群では、それぞれの Fab-fragment 0.5 mg/0.5 ml 生理食塩水を初回 bolus 投与し、次いで 0.5 mg/6.0 ml 生理食塩水を Exp 1, Exp 2 を通じて持続注入し、計 1.0 mg の Fab-fragment を投与した。Time-control 群には、同容量の生理食塩水のみを投与した。

#### 2・4・2 腎血行動態に対する抗 KAL-Fab 投与の影響

Fig. 2 中段のプロトコル 2 に従い、B 群ラットを用い生理食塩水持続投与 2 時間後より実験を開始した。実験は、抗 KAL-Fab 投与前の 40 分間 (control period: cont) と投与直後の 40 分間 (experimental period 1: Exp 1)、それに次ぐ 40 分間 (experimental period 2: Exp 2) の 3 実験期に分け、糸球体濾過率 (GFR)、腎血流量 (RBF)、MBP、尿中 kallikrein 活性、尿中 kinin 排泄量、UV、UNaV を同時測定した。抗 KAL-Fab、抗 ricin-Fab の投与 (抗 KAL-Fab 群: n=7、抗 ricin-Fab 群: n=6) は、それぞれの Fab-fragment 2.0 mg/0.5 ml 生理食塩水として静脈内へ bolus 投与した。また、生理食塩水 0.5 ml のみを投与した群を対照群 (time-control: n=5) として諸量を測定した。

#### 2・4・3 尿中 prostaglandin E<sub>2</sub> 排泄に対する抗 KAL-Fab 投与の影響

最後に kallikrein 活性抑制時の prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の尿中排泄動態を検討した。

A 群ラットを用い、生理食塩水持続注入 2 時間後より、Fig. 2 下段のプロトコル (プロトコル 3) に従い、実験を進めた。プロトコル 2 と同様に、抗 KAL-Fab 2.0 mg/0.5 ml 生理食塩水を bolus 投与した群 (抗 KAL-Fab 群: n=6) および抗 ricin-Fab 2.0 mg/0.5 ml 生理食塩水を bolus 投与した群 (抗 ricin-Fab 群: n=5) の 2 群について、Fab 投与前 40 分間の control 期と投与後 40 分間毎の Exp 1, Exp 2 の 3 実験期で、UV、UNaV、尿中 kallikrein 活性、尿中 kinin 排泄量、尿中 PGE<sub>2</sub> 排泄量を測定した。

### 2・5 測定法

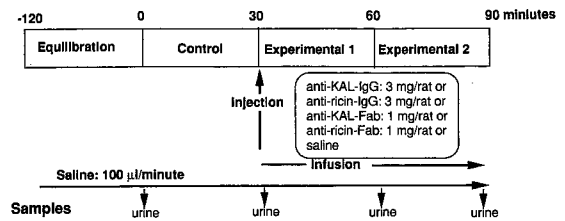
#### 2・5・1 尿中ナトリウム排泄量 (UNaV)

尿中 Na 濃度をイオン電極法 (NOVA-1: Nova Biochemical, Newton, MA) により測定し、毎分、ラット体重 100 g 当りの UNaV ( $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$ ) を算出した。

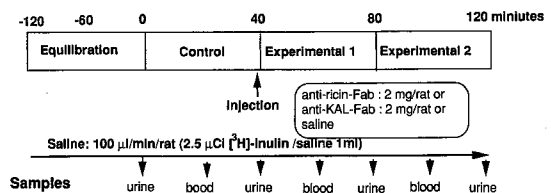
#### 2・5・2 尿中 kallikrein 活性、尿中 kinin 量

尿中 kallikrein 酵素活性の測定には、kinin 産生能

### PROTOCOL 1



### PROTOCOL 2



### PROTOCOL 3

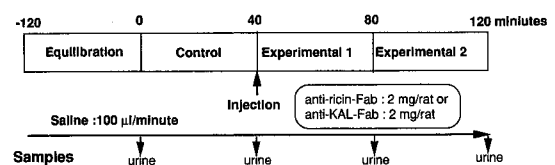


Fig. 2 Schematic representation of experimental protocols 1, 2 and 3.

anti-KAL-IgG and anti-KAL-Fab: intact IgG of monoclonal antibody against glandular kallikrein and its Fab fragment, respectively. anti-ricin-IgG and anti-ricin-Fab: intact IgG of monoclonal antibody to ricin which is vegetable protein and its Fab-fragment, respectively.

を指標とする kininogenase 法<sup>17)</sup>を用いた。尿中 kinin 排泄量測定においては、4℃にて採尿した尿試料に 100 mM の EDTA と 10 mM の 1-10 phenanthroline 溶液を加えて kininase 活性を阻害し、さらに 4℃ 100% ethanol にて kallikrein 活性を抑制した。その一部を窒素ガスにて蒸発乾固後 assay buffer にて再溶解して kinin RIA 法<sup>23)</sup>に供した。なお、20 ng の lysyl-bradykinin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) を新鮮ラット尿に加えた際の本法の回収率は 91.5±3.1% (n=5) であった。

#### 2・5・3 糸球体濾過率 (GFR)

糸球体濾過率 (GFR) は <sup>3</sup>H-inulin (NEN Research, Boston, MA) を用いたクリアランス法で計測した。すなわち、<sup>3</sup>H-inulin を 2.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  となるように生理食塩水に溶解し、実験開始 1 時間前より毎分 100  $\mu\text{l}$  の速度で持続注入、各実験期毎に、中間点で採血して得た

血漿試料 10  $\mu$ l と、採尿試料 10  $\mu$ l 中の  $^3$ H-放射活性を  $\beta$ -シンチレーションカウンターで測定し、毎分、ラット体重 100 g 当りの inulin クリアランス (ml/min/100 g) を算出した。

#### 2.5.4 尿中 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 排泄量

ラット尿中 PGE<sub>2</sub> は採尿試料 1.0 ml を 5 規定塩酸にて、pH を 3 以下とし、10% methanol で前処置した Sep Pak C-18 カートリッジ (Waters, Milford, MA) に通し、ethyl formate で抽出<sup>19)</sup>して、既報の PGE<sub>2</sub>-RIA<sup>21)</sup>により測定した。10 ng の PGE<sub>2</sub> (Sigma Chemical, St. Louis, MO) をラット新鮮尿に加えた際の本法による回収率は 87.5 $\pm$ 5.9% (n=5) であった。

#### 2.5 統計処理

群間の統計学的有意差は one way analysis of variance (ANOVA) により、各実験期における変化の有意差は、Students' two sample t-test あるいは Welch's test を用いて検討した。また、2つのパラメーターの相関は、linear regression analysis により検討した。数値はすべて mean $\pm$ SEM で示し、p<0.05 を有意水準とした。

### 3 成績

#### 3.1 *In vitro* 実験における抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab の kallikrein 活性抑制の効果

Fig. 3 に腺性 kallikrein 10 pg 活性に対する抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab の抑制能に関する成績を示す。抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab はともに 0.05, 0.5, 5.0, 50.0  $\mu$ g/tube の含量で kininogenase 活性を、前者では各々、6.4 $\pm$ 5.5%, 84.1 $\pm$ 1.6%, 89.8 $\pm$

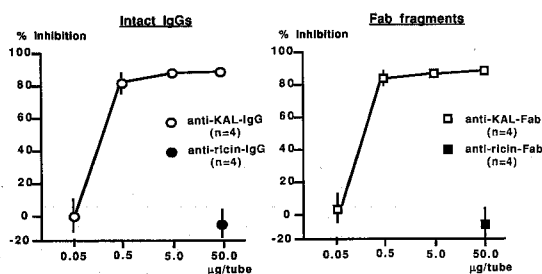


Fig. 3 Inhibitory ability of intact IgG (anti-KAL-IgG) and Fab fragment (anti-KAL-Fab) from glandular kallikrein monoclonal antibody against enzymatic activity of kallikrein. Both intact IgG (left) and Fab fragment (right) from glandular kallikrein monoclonal antibody inhibit kininogenase activity of kallikrein. While control IgG and its Fab fragment (anti-ricin-IgG and anti-ricin-Fab) showed no inhibitory effect of kallikrein activity.

0.5%, 90.7 $\pm$ 0.6%抑制し、後者でも各々0.5 $\pm$ 7.5%, 84.7 $\pm$ 2.0%, 89.5 $\pm$ 1.1%, 89.6 $\pm$ 0.6%抑制した。両者とも 0.5  $\mu$ g/tube 以上の含量で kallikrein 活性を 80%以上抑制した。一方、それぞれの対照である抗 ricin-IgG, 抗 ricin-Fab は 50.0  $\mu$ g で kallikrein 活性抑制率がそれぞれ -10.6 $\pm$ 7.6%, -8.5 $\pm$ 8.9%と抑制効果を示さなかった。以上より本研究で用いた抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab はともに腺性 kallikrein 活性に対して十分な阻害作用を有することが確認された。

#### 3.2 抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab の投与実験

##### 3.2.1 平均血圧の変化

Table 1 にプロトコール 1 における各群の体重 (BW), ヘマトクリット値 (Ht), 平均血圧 (MBP) の成績を示す。各群間で BW, Ht の有意差はなく、各群共抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab 投与前後で MBP の有意な変動を認めなかった。以上より本研究で用いた量の抗

Table 1 Values of BW, Ht and BP in protocol 1

Group	(n)	BW(g)	Ht(%)	MBP(mmHg)	
time-cont	(6)	270 $\pm$ 5	43 $\pm$ 1	cont	99 $\pm$ 2
				Exp 1	102 $\pm$ 4
				Exp 2	100 $\pm$ 3
anti-ricin-IgG	(6)	273 $\pm$ 6	45 $\pm$ 1	cont	102 $\pm$ 2
				Exp 1	102 $\pm$ 3
				Exp 2	105 $\pm$ 5
anti-KAL-IgG	(6)	271 $\pm$ 8	44 $\pm$ 1	cont	102 $\pm$ 2
				Exp 1	102 $\pm$ 2
				Exp 2	104 $\pm$ 3
anti-ricin-Fab	(9)	257 $\pm$ 4	45 $\pm$ 1	cont	101 $\pm$ 3
				Exp 1	102 $\pm$ 4
				Exp 2	103 $\pm$ 4
anti-KAL-Fab	(9)	268 $\pm$ 5	45 $\pm$ 1	cont	105 $\pm$ 3
				Exp 1	106 $\pm$ 3
				Exp 2	105 $\pm$ 3

Values are mean $\pm$ SEM. n=rat number of each experiment.

time-cont: time-control group.

anti-ricin-IgG: intact IgG of ricin monoclonal antibody injected group.

anti-KAL-IgG: intact IgG of kallikrein monoclonal antibody injected group.

anti-ricin-Fab: Fab fragment of ricin monoclonal antibody injected group.

anti-KAL-Fab: Fab fragment of kallikrein monoclonal antibody injected group.

BW: body weight, Ht: hematocrit, MBP: mean blood pressure.

cont: control period, Exp 1: first experimental period, Exp 2: second experimental period.

KAL-IgG, 抗 KAL-Fab は, MBP に有意な影響を与えないことが確認された。

### 3・2・2 尿中 kallikrein 活性, kinin 排泄量および UV, UNaV の変化

Fig. 4 にプロトコール 1 で施行した抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab 投与後の Exp 1, Exp 2 における尿中 kallikrein 活性及び kinin 排泄量を, control period に対する変化率 (%change) として示した。尿中 kallikrein 活性は, time-control, 抗 ricin-IgG, 抗 ricin-Fab の対照 3 群間の比較では群間, cont と Exp 1, Exp 2 の間のいずれにも有意な差異はなかった。抗 KAL-IgG 投与も cont, Exp 1, Exp 2 で有意な変化を示さなかった。しかし, 抗 KAL-Fab 投与群では, cont に比し, Exp 1 で  $-71.7 \pm 3.7\%$  ( $p < 0.001$ ), Exp 2 で  $-73.0 \pm 4.3\%$  と著明 ( $p < 0.001$ ) な尿中 kallikrein 活性の低下が認められた (Fig. 4 上段)。

尿中 kinin 排泄量は対照 3 群間で有意差はなく, 抗 KAL-IgG 投与群と抗 ricin-IgG 投与群間にも有意な差異は認められなかった。一方, 抗 KAL-Fab 投与群では cont に比し Exp 1 で  $-78.4 \pm 8.0\%$  ( $p < 0.001$ ),

Exp 2 で  $-84.2 \pm 5.3\%$  ( $p < 0.001$ ) と, 共に kinin 排泄量は著明に低下し (Fig. 4 下段), 抗 KAL-Fab による尿中 kallikrein 活性抑制と尿中 kinin 排泄量の低下が確認された。

次に, Fig. 5 に UV, UNaV の成績を示す。UV, UNaV はいずれも cont に対する Exp 1, Exp 2 の % change として表した。UV, UNaV は, 対照 3 群間でいずれも有意な変化は認められず, UV は抗 KAL-IgG 投与により有意な変動を示さなかった。しかし抗 KAL-Fab 投与群では, cont に比し Exp 2 が  $-27.0 \pm 7.1\%$  と有意 ( $p < 0.01$ ) に低下した (Fig. 5 上段)。UNaV も UV と同様に対照 3 群及び抗 KAL-IgG 投与群では有意な変化を示さなかったが, 抗 KAL-Fab 投与群のみ cont に比し Exp 2 が  $-21.4 \pm 6.1\%$  と有意 ( $p < 0.01$ ) に低下した (Fig. 5 下段)。

### 3・3 抗 KAL-Fab の投与実験

#### 3・3・1 尿中 kallikrein 活性, kinin 排泄量および UV, UNaV の変化

プロトコール 2 と 3 に従い, 抗 KAL-Fab, 抗 ricin-Fab をおのおの 2.0 mg 静脈内 bolus 投与した際のラッ

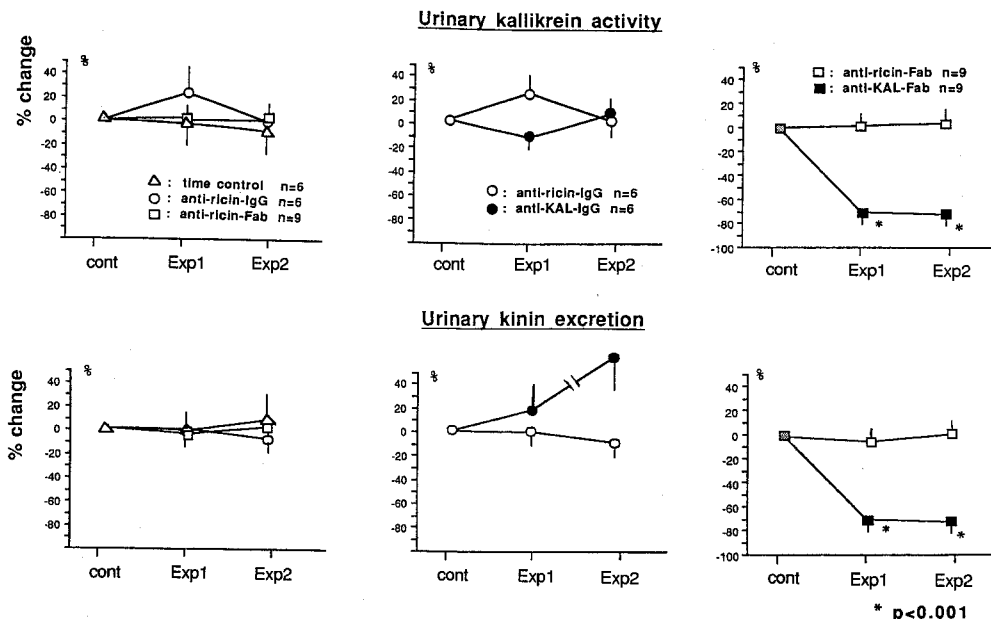
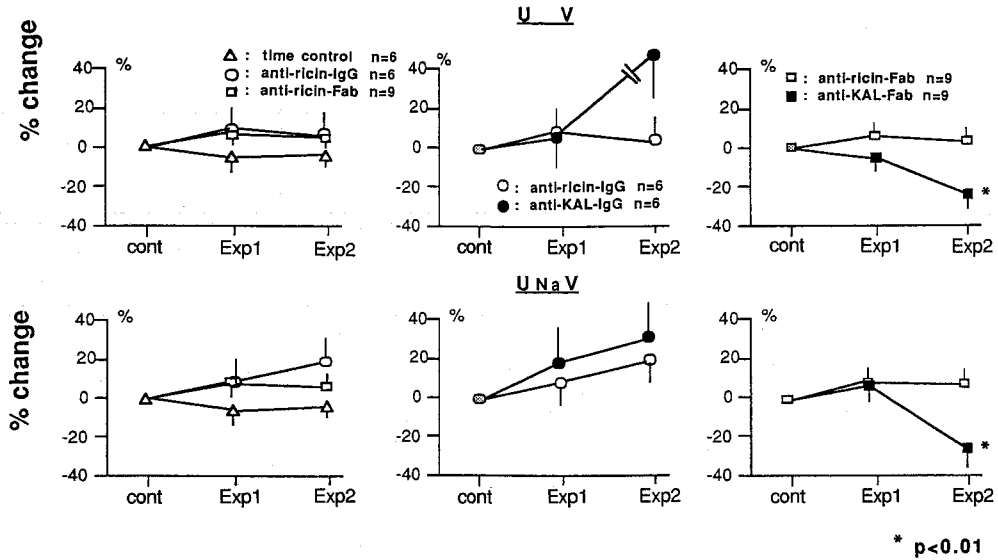


Fig. 4 Effects of 3.0 mg of anti-KAL-IgG and 1.0 mg of anti-KAL-Fab on urinary kallikrein activity and kinin excretion expressed as per cent change from the control period.

As controls, the administrations of 3.0 mg of anti-ricin-IgG, 1.0 mg of anti-ricin-Fab and saline (time-cont) were used.

\*;  $p < 0.001$  vs. control period.

cont: control period, Exp 1: first experimental period, Exp 2: second experimental period



**Fig. 5** Changes in urine volume (UV) and urinary sodium excretion (UNaV) after administration of 3.0 mg anti-KAL-IgG and anti-KAL-Fab. Values are expressed as per cent change from the control period. anti-ricin-IgG, anti-ricin-Fab and time-cont were used as controls.

\* p < 0.01 vs. control period.

トの BW, 尿中 kallikrein 活性, 尿中 kinin 排泄量, UV, UNaV の推移を table 2 に示す. 抗 KAL-Fab 投与群では, プロトコル 1 の成績と同様に, 抗 KAL-Fab 投与後尿中 kallikrein 活性と尿中 kinin 排泄量の有意 (共に, p < 0.001) な低下を認め, また UV, UNaV も有意 (共に, p < 0.001) に低下した. 一方, 対照群である抗 ricin-Fab 投与群では, いずれのパラメータにも有意な変化を認めなかった.

**3・3・2 平均血圧 (MBP), 糸球体濾過率 (GFR), 腎血流量 (RBF) の変化**

プロトコル 2 における BW, Ht, MBP, GFR, ΔRBF (cont に対する Exp 1, Exp 2 の変化率: % change) を Table 3 に示した. 各群共, MBP, GFR, ΔRBF はいずれも cont に比して Exp 1, Exp 2 で有意な変化を示さず, 抗 KAL-Fab 投与による腎 kallikrein-kinin 系の変化に, 腎血行動態の変動は伴わないことが確認された.

**Table 2** Effects of anti-ricin-Fab and anti-KAL-Fab on the changes in renal function in protocol 2 and 3

Group (n)	BW (g)	Urinary kallikrein (ng/(min) <sup>2</sup> /100 g)	Urinary kinin excretion (pg/min/100 g)	UV (μl/min/100 g)	UNaV (μEq/min/100 g)	
anti-ricin-Fab (n=13)	294 ± 3	cont	10.7 ± 1.8	36.4 ± 5.1	26.6 ± 2.6	4.3 ± 0.4
		Exp 1	13.9 ± 3.6	31.6 ± 6.3	24.2 ± 2.0	4.2 ± 0.3
		Exp 2	12.8 ± 3.1	39.7 ± 7.0	29.9 ± 2.3	4.9 ± 0.4
anti-KAL-Fab (n=11)	303 ± 4	cont	13.7 ± 3.5	45.4 ± 7.9	27.2 ± 2.2	4.9 ± 0.3
		Exp 1	1.9 ± 0.7***	8.3 ± 3.2***	24.2 ± 1.7	4.5 ± 0.2*
		Exp 2	2.5 ± 1.1**	10.8 ± 2.7***	19.0 ± 1.1***	3.4 ± 0.1***

Evaluation of change from the control period to the experimental period.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

Values are mean ± SEM. n = rat number of each experiment.

anti-ricin-Fab: Fab fragment of ricin monoclonal antibody injected group, anti-KAL-Fab: Fab fragment of kallikrein monoclonal antibody injected group BW: body weight, UV: urine volume, UNaV: urinary sodium excretion.

cont: control period, Exp 1: first experimental period, Exp 2: second experimental period.

**Table 3** Effects of anti-ricin-Fab and anti-KAL-Fab on the changes in renal hemodynamics

Group (n)	BW(g)	Ht(%)	MBP(mmHg)	GFR(ml/min/100 g)	$\Delta$ RBF(%change)	
time-cont (5)	305 $\pm$ 5	44 $\pm$ 1	cont	94 $\pm$ 4	1.7 $\pm$ 0.2	
			Exp 1	99 $\pm$ 3	1.6 $\pm$ 0.2	+5.5 $\pm$ 3.6
			Exp 2	100 $\pm$ 3	1.6 $\pm$ 0.2	+6.7 $\pm$ 6.2
anti-ricin-Fab (7)	295 $\pm$ 4	44 $\pm$ 1	cont	100 $\pm$ 4	1.6 $\pm$ 0.2	
			Exp 1	100 $\pm$ 3	1.5 $\pm$ 0.1	-0.2 $\pm$ 4.6
			Exp 2	101 $\pm$ 3	1.6 $\pm$ 0.2	-1.0 $\pm$ 4.9
anti-KAL-Fab (6)	309 $\pm$ 5	42 $\pm$ 1	cont	100 $\pm$ 3	1.6 $\pm$ 0.1	
			Exp 1	101 $\pm$ 3	1.6 $\pm$ 0.1	-1.6 $\pm$ 2.5
			Exp 2	101 $\pm$ 2	1.6 $\pm$ 0.2	-0.4 $\pm$ 2.9

Values are mean $\pm$ SEM. n=rat number of each experiment.

time-cont: time control group.

anti-ricin-Fab: Fab fragment of ricin monoclonal antibody injected group.

anti-KAL-Fab: Fab fragment of kallikrein monoclonal antibody injected group.

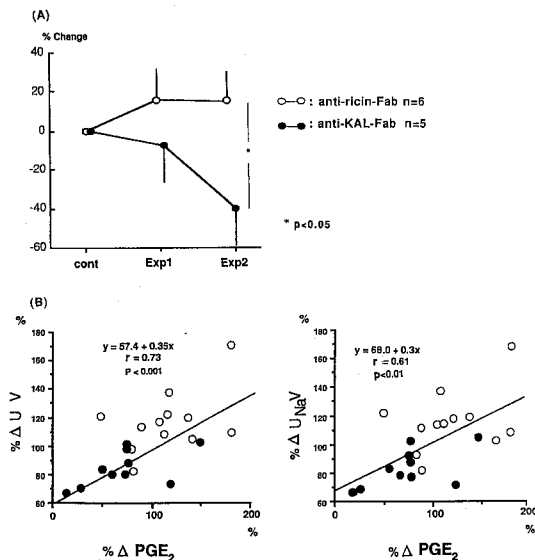
BW: body weight, Ht: hematocrit, MBP: mean blood pressure

GFR: glomerular filtration rate, RBF: renal blood flow.

cont: control period, Exp 1: first experimental period, Exp 2: second experimental period.

### 3.3.3 尿中 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 排泄量

プロトコール 3 で行った尿 PGE<sub>2</sub> 排泄量の成績を Fig. 6 に示す。PGE<sub>2</sub> 排泄量の変化率は、抗 ricin-Fab 投与



**Fig. 6** (A) Change in urinary PGE<sub>2</sub> excretion after intravenous bolus injection of anti-KAL-Fab (2.0 mg) or anti-ricin-Fab (2.0 mg) presented as per cent change from control period. \* p<0.05.

(B) Correlation between the change of urine volume (%ΔUV: left) or urinary sodium excretion (%ΔUNaV: right) and the change of urinary excretion of PGE<sub>2</sub> (%ΔPGE<sub>2</sub>) after intravenous administration of 2.0 mg anti-KAL-Fab or 2.0 mg anti-ricin-Fab.

群に比し抗 KAL-Fab 投与群が、Exp 2 で有意に低値 (p<0.05)であった(Fig. 6 上段)。Fig. 6 下段に Exp 1, Exp 2 における尿中 PGE<sub>2</sub>排泄量の変化率(%ΔPGE<sub>2</sub>)と UV の変化率(%ΔUV)との相関、及び%ΔPGE<sub>2</sub>と UNaV の変化率(%ΔUNaV)の相関を示す。%ΔPGE<sub>2</sub>と%ΔUV (r=0.73: p<0.001), %ΔPGE<sub>2</sub>と%ΔUNaV (r=0.61: p<0.01)との間には、いずれも有意な正相関が認められ、腎 kallikrein-kinin 系抑制時の UV, UNaV の変化には、PGE<sub>2</sub> 産生低下が関与している可能性が示唆された。

## 4 考 察

腎では prekallikrein が活性化されて kallikrein となり<sup>22)</sup>、このものは主に低分子 kininogen に作用して生理的活性物質である kinin を生成し、kinin は kininases により不活性化される<sup>23)</sup>。そして、電子顕微鏡<sup>24)</sup>や、組織化学的方法<sup>25)</sup>によれば、kallikrein は主に遠位尿細管(接合部尿細管)上皮細胞管腔側に存在し、一部が血管側に存在するとされる。また、尿中 kallikrein 活性は腎 kallikrein 活性を反映すると考えられている<sup>26)</sup>。

一方、基質である低分子 kininogen も遠位尿細管に存在することが明らかにされ<sup>27)</sup>、更に kinin 受容体もこの部位に証明される<sup>28)</sup>など、本系のすべての因子が尿細管遠位部に存在する。しかしながら、その作用部位については同じ単離尿細管を用いた kinin の投与実験でも、Kauker *et al.*<sup>4)</sup>は管腔側における Na 排泄促進作



用を述べ、Tomita *et al.*<sup>29)</sup> は血管側のみにおける kinin の作用効果を報告し、未だに一致した見解は得られていない。そこで本研究では、まず第一に抗ラット腎 kallikrein のモノクロナール抗体から IgG, Fab-fragment をそれぞれ精製し、後者は糸球体膜を通過するが、前者は糸球体を通過しえない特性<sup>30,31)</sup>を利用して、腎 kallikrein-kinin 系の作用部位を検討した。その結果、抗 KAL-IgG 投与は尿中 kallikrein 活性を低下させず、抗 kallikrein 抗体が糸球体を濾過せず、尿細管血管側のみにも作用しても尿中 kallikrein 活性は抑制されず、水・Na 代謝にも影響を与えないことが判明した。

一方、*in vitro* では抗 KAL-IgG と同様の kallikrein 活性抑制作用を示し、尿細管の管腔側、血管側両面に作用する抗 KAL-Fab を投与した際には、尿中 kallikrein 活性は最大  $85.2 \pm 5.3\%$  の低下となった。すなわち、糸球体を濾過する抗 KAL-Fab は尿中 kallikrein 活性を抑制するが、それを濾過しない抗 KAL-IgG にこの効果が認められなかった。加えて、抗 KAL-Fab 投与による尿中 kallikrein 活性および kinin 排泄量の低下に伴い、UV, UNaV はそれぞれ  $-27.0 \pm 7.1\%$ ,  $-21.4 \pm 6.1\%$  と、いずれも有意に低下した。以上の所見は、尿細管々腔側で kallikrein が kinin の産生を介して水・Na 代謝に関与していることを強く示唆するものといえる。Pollock *et al.*<sup>19)</sup> は aprotinin で kallikrein 活性を抑制しても、水・Na 排泄に明らかな影響は与えなかったと報告し、著者らとは異なる見解を述べている。しかしながら、aprotinin は非特異的な protease 阻害物質で、kallikrein に対する特異性も低く、加えて心抑制など循環動態に変化を与える条件<sup>32)</sup>での検討であることが、このような異なった結果をもたらしたものと推測される。

次に著者らは、腎 kallikrein 抑制時の水・Na 代謝変動の機序を明らかにすべく、まず、kallikrein 活性阻害時の MBP, GFR, RBF を測定した。その結果、抗 KAL-IgG, 抗 KAL-Fab いずれの投与によっても MBP, RBF, GFR に有意な変化はみられず、少なくとも、正常血圧非麻酔ラットにおける kallikrein 抑制時の水・Na 排泄の変化は、腎血行動態の変化を介さずに派生するものと考えられた。以上の結果から、腎 kallikrein-kinin 系の活性抑制は、腎の血行動態を介することなく、恐らくは腎尿細管々腔側の kinin 作用の減弱に基づく水・Na 排泄の変化をもたらすと推測された。

そこで次に、この機転をさらに詳細に追究する目的

で尿中 PGE<sub>2</sub> の測定を試みた。Kinin は phospholipase A<sub>2</sub> に対する直接刺激作用や、腎血行動態などの間接的機序を介して、PG の産生を促進するとされる<sup>33)</sup>。一方、腎では特に PGE<sub>2</sub> が多く存在し、水・Na 代謝に密接に関わっていること<sup>34)</sup>より、本研究では内因性 kallikrein 抑制時の尿中 PGE<sub>2</sub> の測定を試みた。そして、抗 KAL-Fab 投与群のみで、尿中 kinin 排泄低下と同時に PGE<sub>2</sub> の排泄低下を認め、管腔側 kinin が PGE<sub>2</sub> 産生を調節していることが窺われた。更に尿中 PGE<sub>2</sub> 排泄量の変化率と尿量及び尿中 Na 排泄量の変化率との間に有意な正の相関関係が得られた。つまり、腎 kallikrein-kinin 系は、kinin による直接作用に加えて、kinin の PGE<sub>2</sub> 産生促進作用を介して水・Na 代謝に関与している可能性が示された。

腎における kinin の作用に関する *in vivo* の検討ではこれまで、DOCA 投与ラットの鉍質コルチコイド過剰状態下<sup>19)</sup>での、あるいは kininase 阻害剤投与時の kinin 活性亢進状態下<sup>23,35)</sup>の水・電解質代謝を検討した報告をみるのみである。本研究で得られた所見は、非麻酔下正常血圧状態で内因性 kallikrein-kinin 系は腎尿細管々腔側で paracrine hormone として働き、一部 PGE<sub>2</sub> の合成促進を介して水・Na 代謝に関与していることを示しており、生理的条件下の腎 kallikrein-kinin 系の作用機転を解明する上で極めて興味深い成績と思われた。

## 5 要 約

*In vivo* における腎 kallikrein-kinin 系の水・Na 代謝に及ぼす作用機転を究明すべく、正常血圧非麻酔ラットを用い、腎 kallikrein 活性阻害作用を持つ抗腺性 kallikrein モノクロナール抗体の精製 IgG (抗 KAL-IgG) とその Fab-fragment (抗 KAL-Fab) の投与を行ない、腎 kallikrein 抑制の水・電解質代謝に及ぼす影響とその作用機転を検討した。

1) *In vitro* で抗 KAL-IgG, および抗 KAL-Fab はいずれも腺性 kallikrein 活性を明らかに抑制した。

2) *In vivo* (正常血圧非麻酔ラット) における抗 KAL-Fab の投与で、尿中 kallikrein の活性低下とそれに伴う尿中 kinin 排泄量の減少を認めたが、抗 KAL-IgG の投与ではこれらの変化は生じなかった。

3) 抗 KAL-Fab の投与は、UV, UNaV を有意に減少させたが、対照として用いた抗 ricin Fab-fragment (抗 ricin-Fab) 投与では有意な変化を認めなかった。

4) 抗 KAL-Fab 及び抗 ricin-Fab の投与は、いづ

れも MBP, RBF, GFR に有意な影響を与えなかった。

5) 抗 KAL-Fab の投与は尿中 PGE<sub>2</sub> 排泄量を有意に減少させた。尿中 PGE<sub>2</sub> 排泄量の変化率と UV, UNaV のそれらとの間には有意な正の相関がみられた。

以上より、腎 kallikrein-kinin 系の作用、特に尿細管々腔側の本系の作用機序解明の上で、抗 KAL-Fab の投与は極めて有用な手段と考えられた。そして、本法により、正常血圧非麻酔下で、腎 kallikrein-kinin 系は腎尿細管々腔側より作用し、水・Na 排泄に強く関与していることが結論された。また本作用の一部は kinin により誘導される prostaglandin E<sub>2</sub> 産生促進を介している可能性が強く示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なご指導、御校閲を頂いた札幌医科大学医学部内科学第 2 講座 飯村 攻教授に深謝いたします。

#### 文 献

- Margolius HS, Geller R, Pisano JJ, Sjoerdsma A. Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension. *Lancet* 1971, ii: 1603-1605.
- Fenoy FJ, Scicli AG, Carretero OA, Roman RJ. Effect of an angiotensin I and a kinin receptor antagonist on the renal hemodynamic response to captopril. *Hypertension* 1991, 17: 1038-1044.
- Wang Y-X, Gavras I, Lammek B, Bresnahan M, Gavras H. Effect of bradykinin and prostaglandin inhibition on systemic and regional hemodynamics in conscious normotensive rats. *J Hypertens* 1991, 9: 805-812.
- Kauker ML. Bradykinin action on the efflux of luminal <sup>22</sup>Na in the rat nephron. *J Pharmacol Exp Ther* 1980, 214: 119-123.
- Nasjletti A, McGiff JC, Colina-Chourio J. Interactions of the renal kallikrein system and renal prostaglandins in the conscious rat; influence of mineralocorticoids. *Circ Res* 1978, 43: 799-807.
- Kenny AJ, Stephenson SL. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett* 1988, 232: 1-8.
- Bonventre JV, Nemenoff R. Renal tubular arachidonic acid metabolism. *Kidney Int* 1991, 59: 438-449.
- Iimura O. Pathophysiological significance of sympathetic function in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*[A] 1989, II (Supp 1): 103-115.
- Carretero OA, Scicli AG. Kinins, paracrine hormones in the regulation of blood flow, renal function, and blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM, Kaplan NM, editors. *Endocrine Mechanisms in Hypertension*. Vol. 2 of *Perspectives in Hypertension*. New York, Raven Press, 1988, 219-239.
- Stein JH, Cangbalay RC, Karsh KL, Osgood RW, Ferris TF. The effect of bradykinin on proximal tubular sodium reabsorption in the dog; evidence for functional nephron heterogeneity. *J Clin Invest* 1972, 51: 1709-1721.
- Iino Y, Imai M. Effects of prostaglandins on Na transport in isolated collecting tubules. *Pflügers Arch* 1978, 373: 125-132.
- Marin-Grez M. The influence of antibodies against bradykinin on isotonic saline diuresis in the rat: evidence for kinin involvement in renal function. *Pflügers Arch* 1974, 350: 231-239.
- Pollock DM, Butterfield MI, Ader JL, Arendshorst WJ. Dissociation of urinary kallikrein activity and salt water excretion in the rat. *Am J Physiol* 1986, 250: F1082-F1089.
- Kramer HJ, Moch T, von Sichrer L, Dusing R. Effect of aprotinin on renal function and urinary prostaglandin excretion in conscious rats after acute salt loading. *Clin Sci* 1979, 56: 547-553.
- Savoy-Moore RT, Khullar M, Swartz K, Scicli AG, Carretero OA. Characterization of monoclonal antibodies against rat glandular kallikrein. *J Immunol Methods* 1986, 88: 45-51.
- Fulton RJ, Blakey DC, Knowles PP, Uhr JW, Thorpe PE, Vitetta ES. Purification of ricin A1, A2 and B chains and characterization of their toxicity. *J Biol Chem* 1986, 261: 5314-5319.
- Carretero OA, Oza NB, Piwonska A, Ocholik T, Scicli AG. Measurement of urinary kallikrein activity by kinin radioimmunoassay. *Biochem Pharmacol* 1976, 25: 2265-2270.
- Gellai M, Valtin H. Chronic vascular constrictions and measurements of renal function in conscious rats. *Kidney Int* 1979, 15: 419-426.
- Tomiyama H, Scicli AG, Scicli GM, Carretero OA. Renal effects of Fab fragments of kinin antibodies on deoxycorticosterone-acetate-treated rats. *Hypertension* 1990, 15: 761-766.
- Kirchner KA. Role of antidiuretic hormone in the attenuated furosemide response observed during indomethacin administration. *J Lab Clin Med* 1988, III: 237-243.

21. Seino M, Carretero OA, Albertini R, Scicli AG. Kinins in regulation of uteroplacental blood flow in the pregnant rabbit. *Am J Physiol* 1980, 239: H266-H271.
22. Pisano JJ, Corthon J, Yates K, Pierce JV. The kallikrein-kinin system in the kidney. *Contrib Nephrol* 1978, 2: 116-125.
23. 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.
24. Figueroa CD, Caorsi I, Subiabre J, Vio CP. Immunoreactive kallikrein localization in rat kidney: an immunoelectron-microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1984, 32: 117-121.
25. Vio CP, Figueroa CD. Subcellular localization of renal kallikrein by ultrastructural immunocytochemistry. *Kidney Int* 1985, 28: 36-42.
26. Levy SB, Frigon RP, Stein RA. The relationship of urinary kallikrein to renal salt and water excretion. *Clin Sci Mol Med* 1978, 54: 39-45.
27. Figueroa CD, MacIver AG, MacKenzie JC, Bhoolla KD. Localization of immunoreactive kininogen and tissue kallikrein in the human nephron. *Histochemistry* 1988, 89: 437-442.
28. Tomita K, Pisano JJ. Binding of [<sup>3</sup>H] bradykinin in isolated nephron segments of the rabbit. *Am J Physiol* 1984, 246: F732-F737.
29. Tomita K, Pisano JJ, Knepper MA. Control of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct. *J Clin Invest* 1985, 76: 132-136.
30. Butler VP, Schmidt DH, Smith TW, Haber E, Raynor BD, Demartini P. Effects of sheep digoxin-specific antibodies and their Fab fragments on digoxin pharmacokinetics in dogs. *J Clin Invest* 1977, 59: 345-359.
31. Smith TW, Lloyd BL, Spicer N, Haber E. Immunogenicity and kinetics of distribution and elimination of sheep digoxin-specific IgG and Fab fragments in the rabbit and baboon. *Clin Exp Immunol* 1976, 36: 384-396.
32. Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S. Chronotropic and inotropic effects of bradykinin on isolated blood-perfused canine atrium. *Jpn Heart J* 1980, 21: 121-123.
33. Nasjletti A, Malik KU. Renal kinin-prostaglandin relationship: implications for renal function. *Kidney Int* 1981, 19: 860-868.
34. Farman N, Pradelles P, Bonvalet JP. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, 6-keto-PGF<sub>1</sub>α and TXB<sub>2</sub> synthesis along the rabbit nephron. *Am J Physiol* 1987, 252: F533-F538.
35. Nakagawa M, Stewart JM, Vavrek RJ, Nasjletti A. Effect of a kinin antagonist on renal function in rats. *Am J Physiol* 1990, 258: F643-F648.

---

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 斎藤重幸