

ヒト尿中 Prekallikrein に関する研究

— 測定法の確立と本態性及び内分泌性高血圧症におけるその臨床応用 —

美田 晃 章 島 本 和 明

札幌医科大学内科学第2講座 (主任 飯村 攻 教授)

The Study on Human Urinary Prekallikrein

— A Method for Measurement and Clinical Application in
Patients with Essential and Endocrinological Hypertension —

Teruaki MITA and Kazuaki SHIMAMOTO

Department of Internal Medicine (Section 2), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. O. Iimura)

In order to clarify the pathophysiological role of renal kallikrein-kinin system, a new method for the measurement of urinary prekallikrein was established, and urinary excretions of total kallikrein, kallikrein and prekallikrein were determined in the patients with essential hypertension, primary aldosteronism and Cushing syndrome.

Urinary prekallikrein was converted to an active form by trypsin treatment. Urinary total kallikrein was determined by measuring the kallikrein levels after trypsin treatment. Urinary prekallikrein levels were calculated by subtracting active kallikrein values from total kallikrein values. Kallikrein was measured by both the direct radioimmunoassay (enzyme quantity) and kininogenase assay (enzyme activity) methods. Significant correlations were obtained between immunoreactive kallikrein and kininogenase activity in total kallikrein, active kallikrein and prekallikrein.

In essential hypertensives, urinary excretion of total kallikrein which reflects the renal prekallikrein synthesis, was significantly lower than that in normal subjects. The same tendency was also observed in the urinary excretion of active kallikrein. However, urinary kallikrein/total kallikrein ratio reflecting the conversion ratio from prekallikrein to an active form in the kidney, was the same as normal subjects. These data suggest that the suppressed urinary kallikrein excretion in essential hypertensive patients, may be explained mainly by the inhibited synthesis of prekallikrein in the kidney, and not by a disturbance of the conversion process from prekallikrein to an active form.

In the patients with primary aldosteronism, urinary excretion of kallikrein, total kallikrein and conversion ratio from prekallikrein to an active form were significantly higher than those in normal subjects, suggesting that the augmented urinary excretion of kallikrein in the patients with primary aldosteronism, may be caused by an increase of both the prekallikrein synthesis and conversion from prekallikrein to an active form. In the patients with Cushing syndrome, urinary excretion of total kallikrein and active kallikrein showed no significant differences from those of normal subjects. However, the conversion ratio from a prekallikrein to an active one increased significantly compared to that of normal subjects. The mechanism of the increase in the conversion ratio for Cushing syndrome still remains unknown, although the glucocorticoid may be connected with this mechanism.

Thus, it was concluded that the determination of all components of renal kallikrein-kinin system including prekallikrein seems to be useful to investigate the pathophysiological role of renal kallikrein-kinin system in various hypertensive diseases. (Received August 24, 1987 and accepted September 27, 1987)

Key words: Kallikrein, Prekallikrein, Total kallikrein, Essential hypertension, Primary aldosteronism

1 緒 言

Kallikrein-kinin 系は利尿及びナトリウム利尿促進を介して腎臓での水・電解質代謝の調整に重要な役割を果している¹⁻⁸⁾。そして、本態性高血圧症⁹⁻²¹⁾や二次性高血圧疾患²²⁻²⁷⁾の一部ではこの系の抑制が認められ、その抑制がこれら疾患の成因や病態生理に大きく関わる可能性が推測されている。

他方、腎性 kallikrein-kinin 系の実際上の生物学的活性物質が kinin であることは周知であるが、この kinin の調整、つまりその産生、分解には prekallikrein (前駆物質)、kallikrein, kininogen (基質)、kininase (kinin 破壊酵素) の多因子がかかわって、kallikrein-kinin 系を構成している。そして、ヒトの腎におけるこの系の活性の指標としては、主に尿中の kallikrein 活性や kinin 量を用いられ、かつ計測されてきた。しかし、この両者のみではヒト腎 kallikrein-kinin 系の真の動態は評価しえず、残る他因子の存否の確認や活性計測の必要性が望まれてきた。ことに最近になって Pisano *et al.*²⁸⁾ が、腎性 kallikrein の前駆物質である prekallikrein がヒトの腎のみならず尿中にも存在することを報告し、多くの注目を集めるところとなった。しかし、ヒト尿中の prekallikrein の測定法は未だ確立されたものがなく、またその尿中排泄動態の詳細についても十分な検討はなされていない。そこで本研究では、当教室で開発し、既に報告した高感度で特異性に優れた kallikrein の直接 radioimmunoassay³⁰⁾ を応用し、ヒト尿中 prekallikrein の測定法をまず確立し、次いで本法を用いて本態性高血圧症及び原発性 aldosterone 症、Cushing 症候群における prekallikrein の尿中排泄動態を以下に検討した。

2 実験方法

2.1 尿中 kallikrein の測定法

2.1.1 Kallikrein の直接 radioimmunoassay

Kallikrein の直接 radioimmunoassay (direct RIA) は教室既報²⁹⁾の方法によった。すなわち、1-10 μ l の尿試料と lactoperoxidase 法²⁹⁾により ¹²⁵I で標識した精製ヒト尿 kallikrein、ヒト尿 kallikrein の特異抗体²⁹⁾、及び1%ウシ血清 albumin を含む pH 7.0 の 0.01 M phosphate, 0.14 M NaCl 緩衝液を混和し 20°C で 24 時間インキュベーションした。次いで poly-

ethylene glycol 法により結合型と遊離型を分離し、それぞれの標識 kallikrein の放射活性を Well type auto γ -spectrometer (Aloka)により計測した。なお、本研究に用いたヒト尿 kallikrein の特異抗体は、最終希釈 200 万倍で使用可能な高い力価を有し、かつ prekallikrein とは交差反応を示さないものである。また、本法は 8 pg/tube (0.17 fM/tube)まで測定可能な極めて高感度な測定系である。

2.1.2 Kininogenase assay

Kininogenase 法も著者らが既に報告³⁰⁾した方法に準拠した。すなわち、尿 1 μ l と尿中の諸種 kininase 活性を抑制するために加えられた 30 mM の ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 3 mM の phenanthroline を含む 0.02 M の phosphate 緩衝液 (pH 8.5) 29 μ l (assay buffer) をポリエチレン試験管に入れ、37°C で 5 分間プレインキュベーションした。次いで、あらかじめ 37°C で 5 分間プレインキュベーションした 20 μ l の assay buffer にといた 1.5 μ g のヒト低分子 kininogen を加え、37°C、20 分間インキュベーションし、直ちに氷冷下で ethanol 450 μ l を加えて反応を停止した。3,000 回転、10 分間の遠心分離後、上清 50 μ l を kinin の RIA 用緩衝液 (30 mM の EDTA と 3 mM の phenanthroline を含む 0.01 M phosphate, 0.14 M NaCl に 1% 卵白 albumin を加えたもの、pH 7.0) 950 μ l にて希釈、そのうちの 5-20 μ l を用いて kinin 量を測定し、kinin の産生量を計測した。Kinin の測定は既報の高感度 RIA³¹⁾によった。なお、kallikrein 活性は 24 時間尿を用いて 1 分間あたりの kinin 生成量として表示した。また、本法では、使用する尿量が極めて少ないため、検体中の既存 kinin 含量は無視することができ、対照検体をおく必要性はなかった。

2.2 尿中 prekallikrein の測定法

本法の原理は尿中の prekallikrein を trypsin 処理し、全てを活性型の kallikrein に変換後、kallikrein を求め、更に trypsin 処理前の活性 kallikrein との差より prekallikrein を算出するものである。

本法では、反応はすべて 0.2 M tris 塩酸緩衝液、pH 8.0 (以下緩衝液) 中で行われた。Fig. 1 の B に示すごとく、まず尿試料 40 μ l に緩衝液 80 μ l を加え、37°C、5 分間のプレインキュベーションを行った。次に trypsin (Worthington 社製の chymotrypsin を夾雑し

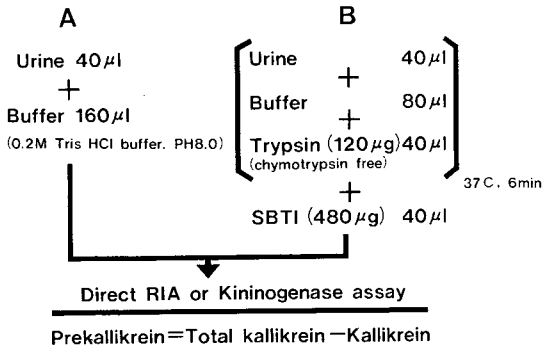


Fig. 1 Assay procedure of urinary total kallikrein and prekallikrein. Urine sample was incubated with chymotrypsin-free trypsin at 37°C for 6 minutes, and the reaction was stopped by addition of SBTI. Afterwards, kallikrein contents were measured with direct radioimmunoassay (direct RIA) and kininogenase assay which represent the total kallikrein. Kallikrein was evaluated in non-treated urine. Prekallikrein was calculated by the subtraction of kallikrein level from total kallikrein level.

ない精製 trypsin) 120 µg を加え、37°C、6 分間インキュベーション後、大豆 trypsin 抑制因子 (soy bean trypsin inhibitor: SBTI, Worthington 社製) 480 µg を加え、反応を停止した。これを前述の kallikrein の direct RIA 及び、ヒト低分子 kininogen を使用した kininogenase assay で測定し総 kallikrein 量とした。さらに Fig. 1 の A に示すごとく、trypsin で処理しない尿試料より kallikrein を direct RIA 及び kininogenase assay で求め、総 kallikrein 量よりこの kallikrein 量をさしひいたものを prekallikrein 量として算出した。

2.3 尿中 prekallikrein 測定法の基礎的検討

まず prekallikrein から kallikrein への変換に要する trypsin 量の検討を行った。尿試料 40 µl に trypsin 120 µg あるいは 240 µg を加え、37°C、6 分間インキュベーションし、それぞれ 2 倍量ないしは 4 倍量の SBTI で反応を停止し、これを direct RIA 及び kininogenase assay で測定した。

次にインキュベーション時間については、同じく 40 µl の尿試料に 120 µg の trypsin を加え、37°C で 1 分、3 分、5 分、7 分、9 分、11 分インキュベーションし、それぞれの kallikrein を direct RIA で測定した。

また、trypsin 及び SBTI の immunoreactivity あるいは kininogenase 活性に及ぼす影響の検討として、尿試料だけの場合、尿試料に 120 µg の trypsin と 480 µg の SBTI を加えた場合、及び尿試料と 120 µg の

trypsin をあらかじめ 37°C で 6 分間インキュベーションした後に SBTI 480 µg で反応を停止した場合、以上の 3 種条件を設定し、それぞれを direct RIA 及び kininogenase assay で測定した。

腎における prekallikrein から kallikrein への変換率は尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比として算出した。

総 kallikrein, kallikrein, prekallikrein それぞれの direct RIA による計測値と kininogenase assay による計測値の相関を後述の健常者、本態性高血圧患者及び原発性 aldosterone 症、Cushing 症候群の 24 時間尿を用いて検討した。

2.4 対象

健常者 7 例 (19—66 歳: 41.1 ± 6.8 歳, mean ± SEM), 本態性高血圧患者 8 例 (26—56 歳: 43.5 ± 5.2 歳: 正 renin 患者 4 例, 低 renin 患者 4 例), 原発性 aldosterone 症患者 4 例 (38—57 歳: 46.4 ± 4.1

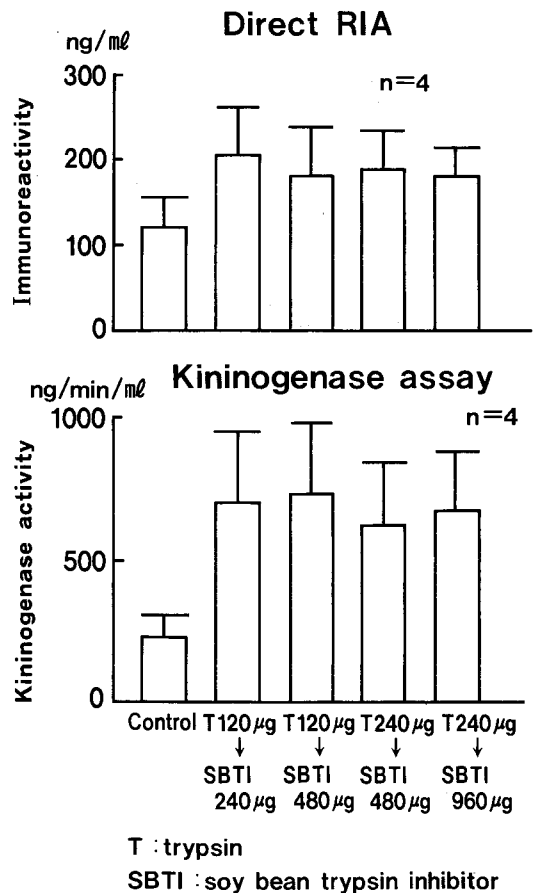


Fig. 2 Effect of various amounts of chymotrypsin-free trypsin on activation of prekallikrein.

歳), Cushing 症候群患者 5 例 (31—46 歳: 35.3 ± 4.3 歳) を対象とした. いずれも, Na 200 mEq, K 75 mEq/日の入院一定食下にて 24 時間尿を 3 日間蓄尿し, それらにおける総 kallikrein, kallikrein, prekallikrein を測定した.

2.5 統計処理

統計処理は Canon BX-1 を用いた Student's t-test により, $p < 0.05$ をもって有意水準とした. 相関は linear regression analysis によった. 一方, 数値は $\text{mean} \pm 1 \text{ S. E.}$ として表現した.

3 成績

3.1 尿中総 kallikrein, prekallikrein 測定法の基礎的検討

健常者 4 例よりえた 4 検体を用い trypsin 処理前後で, direct RIA と kininogenase 法の両測定法により kallikrein を測定した. その結果は Fig. 2 に示すごとく, trypsin 処理により immunoreactivity 及び kininogenase 活性はともに増加し, trypsin 120 μg と 240 μg 使用時, 及び SBTI 240, 480, 960 各 μg 混和時の値には相違を認めなかった. したがって, 以後の計測には prekallikrein の活性化に 120 μg の trypsin

を, また反応停止には 480 μg の SBTI を使用することとした.

次に, インキュベーション時間の検討を Fig. 3 に示す. 縦軸に示す prekallikrein の活性化率は 1 分後既に著明に上昇し, 5 分後にピークに達した後, 7 分後までほぼこの値を保ち, その後は漸減する傾向にあった. 従って, 以後の本測定法にはインキュベーション時間

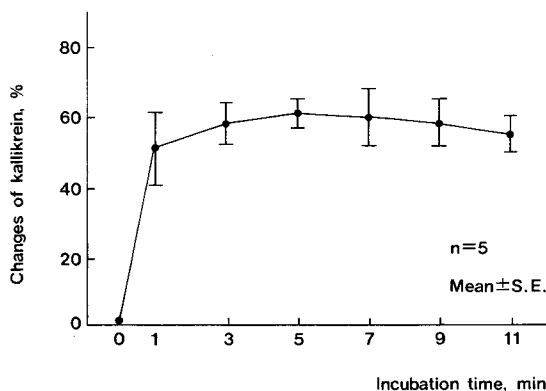


Fig. 3 Effect of incubation time on activation of prekallikrein. Activated prekallikrein levels were represented as percent changes of basal kallikrein.

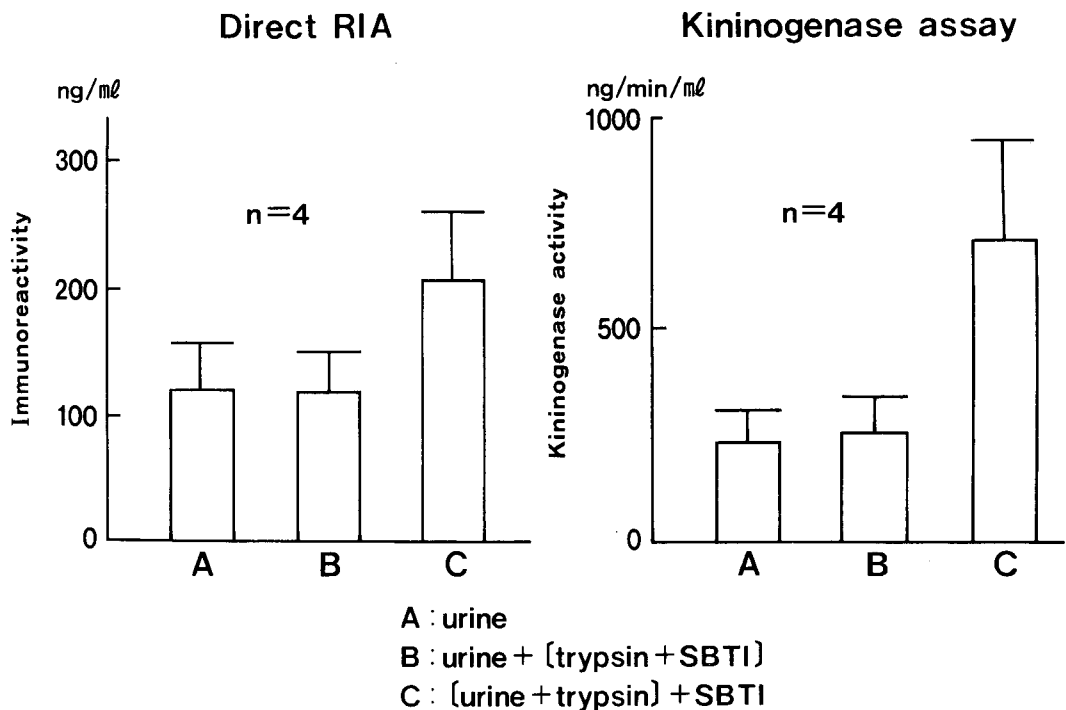


Fig. 4 Effects of chymotrypsin-free trypsin and/or soy bean trypsin inhibitor (SBTI) on direct radioimmunoassay (direct RIA) or kininogenase assay of urinary kallikrein.

を6分間とした。

Immunoreactivity あるいは kininogenase 活性に及ぼす trypsin 及び SBTI の影響に関する検討では、Fig. 4 に示すごとく、あらかじめ SBTI で不活化した trypsin を加えた尿 (B) は無処理尿 (A) との間に差を見ず、trypsin 処理後、SBTI を加えた尿 (C) では、immunoreactivity 及び kininogenase 活性はともに増加した。以上から、trypsin 処理前後の尿試料を測定することによって総 kallikrein, kallikrein を求め、両者の差から prekallikrein 値を算出できることが明らかになった。

次に健常者 6 例、本態性高血圧患者 6 例、原発性 aldosterone 症 4 例、Cushing 症候群 5 例の尿試料を用いて、direct RIA と kininogenase assay 両測定法間の相関を検討した。その結果、総 kallikrein では $r=0.949$, $p<0.001$ (Fig. 5), kallikrein は $r=0.911$, $p<0.001$ (Fig. 6), prekallikrein は $r=0.882$, $p<0.001$ (Fig. 7) と、何れも良好な正相関がえられた。

3・2 臨床成績

対象とした各種疾患における、総 kallikrein, kallikrein, prekallikrein の一日尿中排泄量を Table 1 に示す。Direct RIA により求めた総 kallikrein, kallikrein, prekallikrein 値は、本態性高血圧患者群で、いずれも健常者に比べ有意な低値を示した。さらに、このうちの正 renin 群、低 renin 群別でも、両群ともいずれも健常者に比べ有意な低値を示した。しかし、正

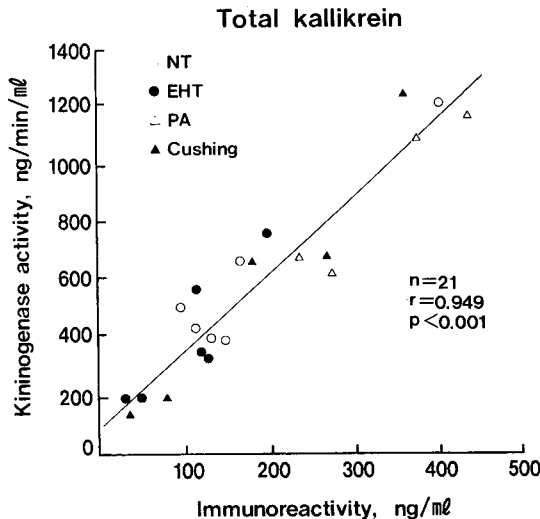


Fig. 5 Correlation between immunoreactivity and kininogenase activity in total kallikrein in 6 normotensives (NT), 6 patients with essential hypertension (EHT), 4 patients with primary aldosteronism (PA) and 5 patients with Cushing syndrome (Cushing).

renin 群と低 renin 群間には有意差をみなかった。同様に、kininogenase assay で求めた総 kallikrein, kallikrein, prekallikrein 値においても、direct RIA の結果

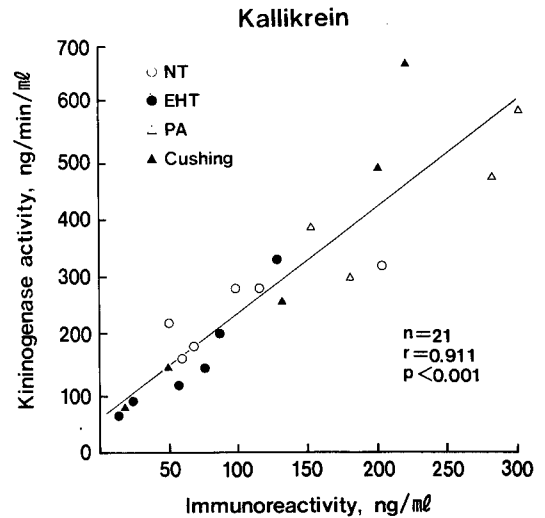


Fig. 6 Correlation between immunoreactivity and kininogenase activity in kallikrein in 6 normotensives (NT), 6 patients with essential hypertension (EHT), 4 patients with primary aldosteronism (PA) and 5 patients with Cushing syndrome (Cushing).

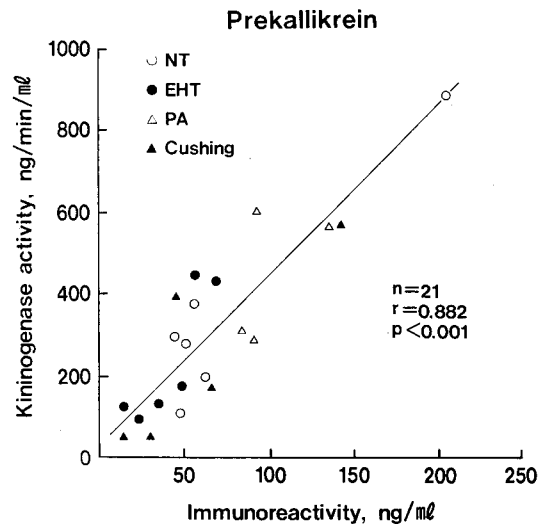


Fig. 7 Correlation between immunoreactivity and kininogenase activity in prekallikrein in 6 normotensives (NT), 6 patients with essential hypertension (EHT), 4 patients with primary aldosteronism (PA) and 5 patients with Cushing syndrome (Cushing). Prekallikrein was calculated by the subtraction of kallikrein from total kallikrein, both of which was determined by direct radioimmunoassay and kininogenase assay.

Table 1 Daily urinary excretions of total kallikrein (total KAL), kallikrein (KAL) and prekallikrein (pre KAL) in normotensives (NT; n=7), essential hypertensives (EHT; n=8) consisting of 4 normal renin (NRH) and 4 low renin hypertensives (LRH), primary aldosteronism (PA; n=4) and Cushing syndrome (Cushing; n=5).

	Direct RIA ($\mu\text{g}/\text{day}$)			kininogenase assay ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{day}$)		
	total KAL	KAL	pre KAL	total KAL	KAL	pre KAL
NT	308.6 \pm 31.4	177.1 \pm 21.4	134.3 \pm 17.1	1271.4 \pm 128.6	471.4 \pm 57.1	785.7 \pm 114.3
EHT	125.7 \pm 32.8**	74.3 \pm 20.7**	48.6 \pm 9.3**	567.3 \pm 135.7**	214.3 \pm 53.6**	346.5 \pm 114.3**
NRH	145.7 \pm 34.2*	85.7 \pm 25.7*	54.3 \pm 7.1*	585.7 \pm 171.4*	257.1 \pm 64.3*	328.6 \pm 135.7*
LRH	105.7 \pm 28.6**	62.8 \pm 15.7**	42.8 \pm 11.4**	542.9 \pm 100.0**	171.4 \pm 42.9**	364.3 \pm 92.9**
PA	717.6 \pm 129.4**	482.4 \pm 94.1**	211.8 \pm 47.1	1962.9 \pm 370.4	981.5 \pm 203.7*	925.9 \pm 185.2
Cushing	288.2 \pm 70.6	194.1 \pm 52.9	94.1 \pm 29.4	962.9 \pm 222.2	518.5 \pm 111.1	407.4 \pm 148.1

NT; normotensive, EHT; essential hypertensive, NRH; normal renin hypertensive, LRH; low renin hypertensive, PA; primary aldosteronism, Cushing; Cushing syndrome

*; p<0.05 VS normotensive, **; p<0.01 VS normotensive

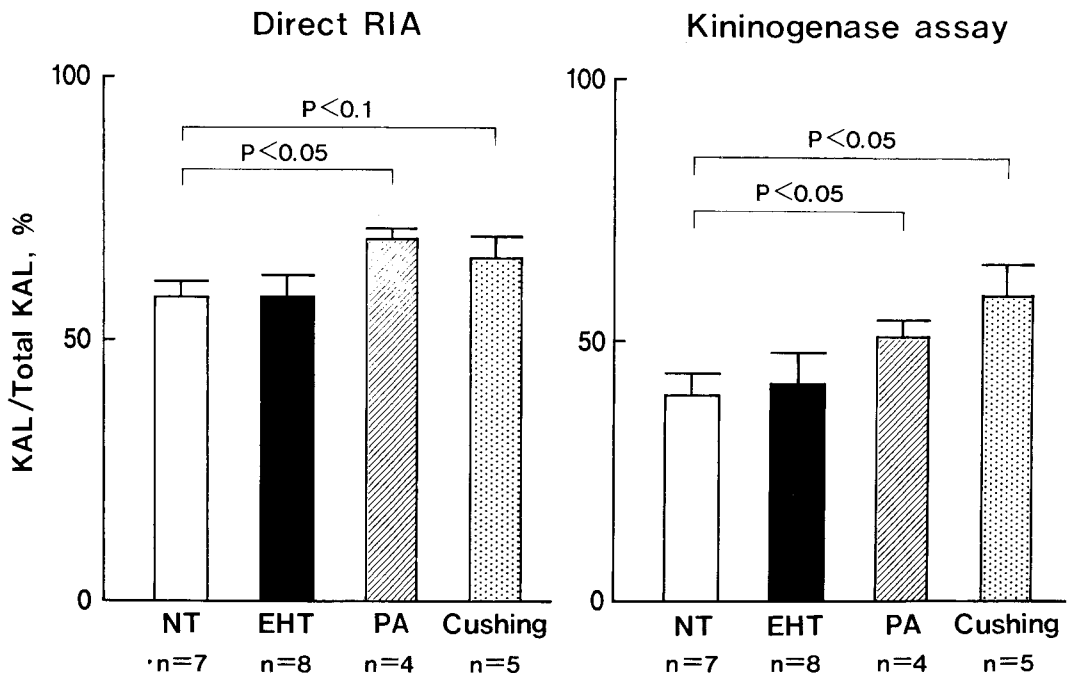


Fig. 8 Urinary kallikrein (KAL)/total kallikrein (Total KAL) ratio in normotensives (NT), essential hypertensives (EHT), primary aldosteronism (PA) and Cushing syndrome (Cushing).

と同様の相違が認められた。

一方、原発性 aldosterone 症における direct RIA の成績では、健常者に比べ総 kallikrein, kallikrein は有意な高値を認めたが、prekallikrein には差異をみなかった。この疾患群の kininogenase assay による値もそれぞれ、direct RIA の結果と同様の傾向であった。

また Cushing 症候群の direct RIA により計測された総 kallikrein, kallikrein, prekallikrein は何れも健常

者との間に差を認めなかった。Kininogenase assay により求めた値にも、direct RIA の成績と同様、健常者との間に差はみなかった。

次に、腎における prekallikrein から活性 kallikrein への変換を検討する目的で、尿中 kallikrein と尿中総 kallikrein の比を検討した。尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比は direct RIA, kininogenase assay それぞれにより、健常者の 56.2 \pm 2.7, 40.0 \pm 3.6% と本態

性高血圧患者群 58.5 ± 4.8 , $41.2 \pm 5.8\%$, 正 renin 群の 59.2 ± 3.8 , $46.2 \pm 6.2\%$, 低 renin 群の 57.7 ± 5.8 , $36.2 \pm 5.4\%$ にはいずれも差を認めなかった。他方, 健常者に比べ, 原発性 aldosterone 症, Cushing 症候群は, 何れの測定法においても高値ないしはその傾向 (69.1 ± 1.8 及び $50.9 \pm 3.2\%$, 65.5 ± 4.1 及び $59.1 \pm 5.9\%$) を示した (Fig. 8).

4 考 察

尿中に prekallikrein の存在することは 1978 年, Pisano *et al.*²⁸⁾ により初めて報告された。ただし, 彼らの測定法は trypsin 処理後, esterase assay による kallikrein 活性を計測する方法であったため, 特異性の面で多くの問題を残していた。そこで本研究では, まず, trypsin で prekallikrein を活性化し, その前後で, kallikrein に特異性の高い direct RIA と kininogenase assay の両測定法を応用することにより, ヒト尿中の総 kallikrein と prekallikrein の正確な測定法の確立を試みた。そして, 尿中 prekallikrein 測定に関する基礎的検討の結果, trypsin は加えた SBTI により完全に不活性化され, 一方, trypsin 及び SBTI のいずれも direct RIA と kininogenase assay の両者に影響を与えないことが明かとなった。また, インキュベーション時間が 3 分から 7 分の間で計測値が一定となり, インキュベーション時間は 6 分が適当と思われた。このように本研究においては, 総 kallikrein 及び prekallikrein は, 原理の異なる二種の kallikrein の測定法, すなわち免疫学的に酵素蛋白量を求める方法と酵素学的に kinin 生成能をみる方法の両者により計測を試みた。両測定法間には, 尿中 kallikrein では当然ながら良好な正相関 ($r=0.911$, $p<0.001$) があったが, 総 kallikrein 及び prekallikrein においても極めて良好な正の相関 (それぞれ $r=0.949$, $r=0.882$, いずれも $p<0.001$) が認められた。このことは, trypsin により生成され免疫学的に同定された kallikrein は同時に kallikrein の酵素活性をも示すものであり, 本法で測定された総 kallikrein, prekallikrein 値は, 生物学的に活性な酵素蛋白, つまりは真の kallikrein の値を反映するものと考えられた。

さて, 腎の kallikrein-kinin 系は, この prekallikrein をはじめ, kallikrein, kininogen, kinin, kininase など多くの因子よりなっている。そこで, 今回確立された測定法で計測され, その存在が確実となった, 尿中の総 kallikrein と prekallikrein の意義について考察してみた。Fig. 9 に示すごとく, まず腎臓での kallikrein がすべて prekallikrein より変換・産生され

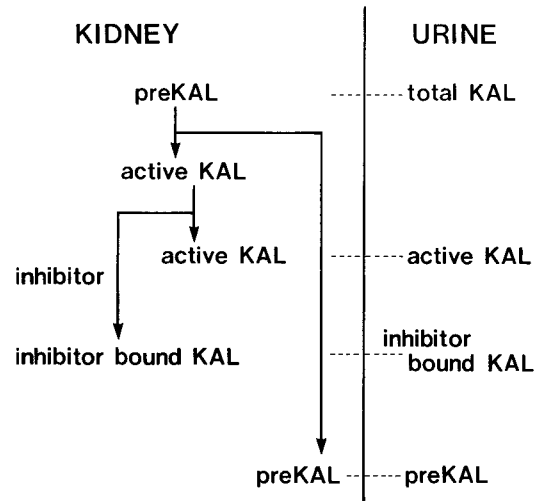


Fig. 9 Hypothetical scheme of various forms of kallikrein in the kidney and urine. KAL: kallikrein

るものとする, 腎で産生された prekallikrein は, 尿中では prekallikrein と kallikrein の和として, つまり総 kallikrein として計測される。腎で生成された prekallikrein は, なんらかの機序により活性化されて, kallikrein として尿中に排泄され, 活性化されなかった残りが prekallikrein として尿中に出現する。従って, 尿中の prekallikrein は, 腎で産生された prekallikrein 全てを反映するものではなく, あくまでも活性化されなかった残りの部分として把握しておく必要がある。

一方活性 kallikrein の一部は阻害因子と結合して, 不活性化されて尿中に排泄されると考えられる³²⁾。Kallikrein の測定法をこの視点から考えると, kininogenase assay では阻害因子結合 kallikrein は計測されず²⁹⁾, 活性 kallikrein のみが測定され, kallikrein の生物活性自体を最もよく反映する。一方, direct RIA では, 活性 kallikrein はもとより阻害因子結合 kallikrein をも kallikrein として認識する^{29,33)}。すなわち, 本来 kallikrein として存在する酵素蛋白の総量を測定する上では最も優れた方法となる。従って, trypsin 処理後に計測される総 kallikrein は, direct RIA では真の意味での総 kallikrein を示し, kininogenase assay では阻害因子結合 kallikrein を除いた kallikrein の生物活性を現すことになる。この様に上述 2 種測定法には各々特徴があり, 両者の特性をよく理解したうえで, 両測定法を用いて kallikrein, 総 kallikrein, prekallikrein を測定することが重要な意味をもってくる。そしてこ

のことが、生体内 kallikrein-kinin 系の分泌動態や病態生理学的意義を検討する上で必須の方法となってくる。

次に、以上の方法を用いて得られた臨床成績について考察する。今回の成績では、在来からも指摘⁹⁻²¹⁾されていたごとく、本態性高血圧患者においては尿中 kallikrein の排泄低下が明示された。尿中総 kallikrein は前述のごとく、腎で産生される prekallikrein の総量を反映するものと思われる。従って、尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比は、腎における prekallikrein から kallikrein への変換率を提示することになる。本研究でえた成績では、本症患者の尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比が健常者のそれと差がなかったこと (Fig. 8) より、本態性高血圧症における腎での kallikrein 産生低下の機序として、prekallikrein から kallikrein への活性化障害の可能性はまず考えられなくなる。そして、尿中総 kallikrein 低下に示されるごとく、尿中 kallikrein の排泄低下は、腎における prekallikrein の産生自体の低下に起因している可能性が強く推測される。他方、Lieberthal *et al.*³⁴⁾ は、本態性高血圧症患者の総 kallikrein 及び kininogenase 活性はともに健常者と差がなく、むしろ尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比の低下が本態性高血圧患者の特異的所見になると述べている。ただし、彼らは kallikrein を kininogenase assay のみで測定し、総 kallikrein は kallikrein と prekallikrein 両者を一括計測する direct RIA で検討しているなど、我々の検討とは測定法が相違する。また、本症患者群で kininogenase 活性が正常者と差がないとする報告は少なく、彼らの報告には少なからざる疑問をさしはさむ余地がありそうである。

一方、従来からも、原発性 aldosterone 症における尿中 kallikrein の排泄増加がしばしば指摘される²⁴⁻²⁷⁾。この排泄増加の機序について、本研究では尿中総 kallikrein の増加が確認され、腎における kallikrein の産生増加がまず一義的な役割を果たしていると考えられた。さらに、この産生増加の機序は、Margolius *et al.*³⁵⁾ が報告するごとく、aldosterone の直接的な kallikrein 産生促進効果によるものと考えたい。ただし、加えて尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比の増大に示されるように、prekallikrein から kallikrein への変換が促進されていることも本症の尿中 kallikrein 排泄増加に関わっているものと考えねばならない。つまり、上述の両機序があいまって、原発性 aldosterone 症においては腎の kallikrein 活性が亢進する結果となるものと推測された。また、本症における kallikrein 活性化率の上昇には、当

然ながら過剰に分泌されている aldosterone の関与を考えねばならないが、その詳細は今後に残された問題となった。

Cushing 症候群患者では、尿中 kallikrein 排泄量が正常対照との間に差を見ず、本症の高血圧発症に腎 kallikrein-kinin 系が本質的な役割を果たしているとは考え難い。ただし、本症患者では、腎における prekallikrein から kallikrein への活性化率を反映すると考えられる尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比の亢進が認められた。この機序は不明といわざるをえないが、過剰な糖質 corticoid が、直接的あるいは間接的に何らかの役割を果たしていることは事実であろう。一方、吉田³⁶⁾ はラットに過剰の糖質 corticoid を投与すると、尿中 kallikrein は抑制され、この機序は腎における prekallikrein から kallikrein への活性化率が低下することによって述べている。ラットを用いたこの実験では、副腎全摘後に大量の dexamethasone を与えており、ヒトにおける著者らの成績とは同じレベルで対比することは難しい。しかしいずれにしても、糖質 corticoid と腎 kallikrein-kinin 系との関連については、今後更に詳しい検討が必要と思われる。

以上、本研究では prekallikrein、総 kallikrein の測定法をまず確立し、それらを用いて本態性高血圧症、原発性 aldosterone 症及び Cushing 症候群における prekallikrein、総 kallikrein の排泄動態を検討した。すなわち、trypsin 処理にて、簡便かつ特異性の高い prekallikrein の測定法を確立した。更に、本態性高血圧における尿中 kallikrein 排泄低下は、腎における prekallikrein から kallikrein への変換抑制というよりは、むしろ腎における prekallikrein 自体の産生低下に起因することが示唆された。また原発性 aldosterone 症患者における尿中 kallikrein の排泄増加は、腎における prekallikrein の産生増加に加え、prekallikrein から kallikrein への変換亢進の両者が関わる可能性が示唆された。そして、Cushing 症候群患者では、尿中 kallikrein 排泄量には正常対照との間に差を見ないが、prekallikrein から kallikrein への活性化率は亢進しており、この機序に関与するであろう糖質 corticoid の役割が注目された。いずれも、詳細な機序は今後の問題として残されたが、上述の成果から明らかにされた新しい視点から、今後、機序解明等の検索を更に志していきたい。

5 結 論

教室既報の kallikrein の測定法を応用した、簡便で

かつ特異性に優れたヒト尿中 prekallikrein の測定法を確立し、更に本態性高血圧症及び内分泌性高血圧症である原発性 aldosterone 症と Cushing 症候群における prekallikrein と総 kallikrein の尿中排泄動態について検討を加え、以下の結論を得た。

1) 尿中 prekallikrein の活性化に trypsin 処理を用い、尿中総 kallikrein, prekallikrein をそれぞれ direct RIA 及び kininogenase assay で求める測定を確立した。両測定法間には尿中 kallikrein はもちろん、prekallikrein 及び総 kallikrein においても、いずれも極めて良好な正相関が認められ、本法による総 kallikrein, prekallikrein の測定の妥当性が十分に示唆された。

2) 本態性高血圧患者においては、尿中 kallikrein, 総 kallikrein 排泄量の低下が認められた。一方、尿中 kallikrein/尿中総 kallikrein 比で示される腎での活性化率は正常であった。以上より、本症の尿中 kallikrein 排泄低下の原因として、腎における prekallikrein の活性化障害よりは、腎における prekallikrein の産生自体の低下が主因となるものと考えられた。

3) 原発性 aldosterone 症患者では尿中 kallikrein はもとより、総 kallikrein 排泄量、活性化率も高値を示した。すなわち、本症における kallikrein 活性亢進の機序として、腎での prekallikrein の産生増加と活性化亢進の両者が関与している可能性が考えられた。

4) Cushing 症候群患者においては、健常者と比較して、尿中 kallikrein 排泄量には差をみなかったが、活性化率の亢進が認められた。その機序の詳細は不明であるが、糖質 corticoid の関与が推測された。

以上より、高血圧の成因や病態形成に重要な意義を持つと考えられる腎の kallikrein-kinin 系の役割を検討する上で、prekallikrein を含むこの系の諸因子の変動を十分に検索する事が非常に有用であることが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、御校閲を頂いた内科学第2講座 飯村 攻教授に深謝し、併せて本研究にご協力頂いた教室員各位に感謝致します。

文 献

1. Levy, S. B., Frigon, R. P. and Stein, R. A.: The relationship of urinary kallikrein to renal salt and water excretion. *Clin. Sci. Mol. Med.* **54**, 39-45 (1978).
2. Horwitz, D., Margolius, H. S. and Keiser, H. R.: Effect of dietary potassium and race on urinary excretion of kallikrein and aldosterone in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **47**, 296-299 (1978).
3. Margolius, H. S., Horwitz, D., Geller, R. G., Alexander, R. W., Gill, J. R., Pisano, J. J. and Keiser, H. R.: Urinary kallikrein excretion in normal man; relationships to sodium intake and sodium retaining steroids. *Circ. Res.* **35**, 812-819 (1974).
4. Zipser, R. D., Kaye, Z. A., Zia, P., Barg, A., Stone, R. A., Mayeda, S. and Horton, R.: Interrelationship of renal prostaglandins and kallikrein in man; effects of dietary and intravenous sodium. *Miner. Electrolyte Metab.* **3**, 151-157 (1980).
5. Mills, I. H., and Ward, P. E.: The relationship between kallikrein and water excretion and the conditional relationship between kallikrein and sodium excretion. *J. Physiol.* **246**, 695-707 (1975).
6. Webster, M. E. and Gilmore, J. P.: Influence of kallidin-10 on renal function. *Am. J. Physiol.* **206**, 714-718 (1964).
7. Willis, L. R., Ludens, J. H., Hook, J. B. and Williamson, H. E.: Mechanism of natriuretic action of bradykinin. *Am. J. Physiol.* **217**, 1-5 (1969).
8. Stein, J. H., Conbaloy, R. C., Korsh, D. L., Osgood, R. W. and Ferris, T. F.: The effect of bradykinin on proximal tubular reabsorption in the dog; evidence for functional nephron heterogeneity. *J. Clin. Invest.* **51**, 1709-1721 (1972).
9. Elliot, A. H. and Nuzum, F. R.: The urinary excretion of a depressor substance (kallikrein of Frei and Kraut) in arterial hypertension. *Endocrinology* **18**, 462-474 (1934).
10. Margolius, H. S., Geller, R., Pisano, J. J. and Sjordsma, A.: Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension. *Lancet* **2**, 1063-1065 (1971).
11. Margolius, H. S., Horwitz, R., Pisano, J. J. and Keiser, H. R.: Urinary kallikrein excretion in hypertensive man; relationship to sodium intake and sodium retaining steroids. *Circ. Res.* **35**, 820-825 (1974).
12. Seino, M., Abe, K., Otsuka, Y., Saito, T., Irokawa, N., Yasujima, M., Chiba, S. and Yoshinaga, K.: Urinary kallikrein excretion and sodium metabolism in hypertensive patients. *Tohoku J. Exp. Med.* **116**, 359-367 (1975).

13. Levy, S. B., Lilley, J. J., Frigon, R. P. and Stone, R. A.: Urinary kallikrein and plasma renin activity as determinants of renal blood flow. The influence of race and dietary sodium intake. *J. Clin. Invest.* **60**, 129-138 (1977).
14. Overlack, A., Stumpe, K. O., Ressel, C., Kollock, R., Zywozok, W. and Kruck, F.: Decreased urinary kallikrein activity and elevated blood pressure normalization by orally applied kallikrein in essential hypertension. *Klin. Wochenschr.* **58**, 37-42 (1980).
15. Zinner, S. H., Margolius, H. S., Rosner, B., Keiser, H. R. and Kass, E. H.: Familial aggregation of urinary kallikrein concentration in childhood; relation to blood pressure, race and urinary electrolytes. *Am. J. Epidemiol.* **104**, 124-132 (1976).
16. Shimamoto, K., Tanaka, S., Nakao, T., Ando, T., Nakahashi, Y., Chao, J., Margolius, H. S. and Iimura, O.: Excretion of human urinary kallikrein quantity measured by a direct radioimmunoassay of human urinary kallikrein in patients with essential hypertension and secondary hypertension. *Jpn. Circ. J.* **45**, 1092-1097 (1981).
17. Shimamoto, K., Nakao, T., Ura, N., Tanaka, S., Ando, T., Nishimiya, T., Mita, T., Kondo, M., Nakagawa, M. and Iimura, O.: The role of the renal kallikrein-kinin system in sodium metabolism in normal and low renin essential hypertension. *Jpn. Circ. J.* **47**, 1210-1215 (1983).
18. Ura, N., Shimamoto, K., Nakao, T., Ogasawara, A., Tanaka, S., Mita, T., Nishimiya, T. and Iimura, O.: The excretion of human urinary kallikrein quantity and activity in normal and low renin subgroups of essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens. [A]* **5**, 329-337 (1983).
19. Ura, N., Shimamoto, K., Tanaka, S., Nishimiya, T., Mita, T., Nakagawa, M., Maeda, T., Yamaguchi, Y. and 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.* **1**, 15-22 (1985).
20. Shimamoto, K., Ura, N., Nakao, T., Nishimiya, T., Mita, T., Kondo, M., Ando, T., Tanaka, S. and Iimura, O.: Role of the renal kallikrein-kinin system in sodium metabolism in normotensives and essential hypertensives. *NZ. Med. J.* **96**, 905-907 (1983).
21. Iimura, O., Shimamoto, K., Ura, N., Mita, T., Tanaka, S., Nishimiya, T., Nakagawa, M. and Yamaguchi, Y.: Study on the renal kallikrein-kinin system in normal and low renin subgroups of essential hypertension. *J. Hypertens.* **2(Suppl 3)**, 297-299 (1984).
22. Mitas, J. A., Levy, S. B., Holle, R., Frigon, R. D. and Stone, R. A.: Urinary kallikrein activity in the hypertension of renal parenchymal disease. *N. Engl. J. Med.* **299**, 162-165 (1978).
23. 島本和明, 安藤利昭, 飯村 攻: 腎実質性高血圧における尿中カリクレイン・キニン系とプロスタグランディンの動態について. *日腎誌* **28**, 1634 (1986).
24. 島本和明, 田中繁道, 小笠原顕夫, 飯村 攻: 鉱質corticoids 過剰による高血圧と腎 kallikrein-kinin 系. *ホルモンと臨床* **32**, 849-853 (1984).
25. Nishimiya, T., Kikuchi, K., Oimatsu, H., Ota, S., Nakamura, Y., Shimamoto, K. and Iimura, O.: A case of normotensive primary aldosteronism; comparison with 13 previously experienced cases with hypertension. *Endocrinol. Jpn.* **31**, 159-164 (1984).
26. Mita, T., Shimamoto, K., Ura, N., Nakao, T., Aoki, K., Nakagawa, M., Tsuzuki, M., Yamazaki, K., Tanaka, S. and Iimura, O.: A case of 17 α -hydroxylase deficiency with special reference to the renal kallikrein-kinin system. *Endocrinol. Jpn.* **30**, 763-767 (1983).
27. Holland, B. D., Chud, J. M. and Braunstein, H.: Urinary kallikrein excretion in essential and mineralocorticoid hypertension. *J. Clin. Invest.* **65**, 347-356 (1980).
28. Pisano, J. J., Corthorn, J., Yates, K. and Pierce, J. V.: The kallikrein-kinin system in the kidney. *Contrib. Nephrol.* **2**, 116-125 (1978).
29. Shimamoto, K., Chao, J. and Margolius, H. S.: The radioimmunoassay of human urinary kallikrein and comparison with kallikrein activity measurements. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**, 840-848 (1980).
30. Kondo, M., Shimamoto, K., Ura, N., Nishimiya, T., Mita, T., Nakagawa, M., Maeda, T., Yamaguchi, Y. and Iimura, O.: A simple and sensitive method for determination of human urinary kallikrein activity (kininogenase activity), using human low molecular weight kininogen. *Endocrinol. Jpn.* **31**, 635-643 (1984).
31. Shimamoto, K., Ando, T., Nakao, T., Tanaka, S., Sakuma, M. and Miyahara, M.: A sensitive radioimmunoassay for urinary kinins in man. *J. Lab. Clin. Med.* **91**, 721-728 (1978).
32. Iimura, O., Shimamoto, K., Ura, N., Nakagawa, M., Nishimiya, T., Ando, T., Yamaguchi, Y.,

- Masuda, A., Ogata, H., Saito, S., Yamaji, I. and Fukuyama, S.: The pathophysiological role of renal dopamine, kallikrein-kinin and prostaglandin systems in essential hypertension. *Agents Actions* (in press) (1987).
33. 浦 信行, 島本和明: ヒト尿 kallikrein 測定法上の諸問題; 本態性高血圧患者尿及び蛋白尿における各種測定法の検討. *札幌医誌* **53**, 519-534 (1984).
34. Lieberthal, W., Arbeit, L., Oza, N. B., Bernard, D. B. and Levinsky, N. G.: Reduced ratio of active-to-total urinary kallikrein in essential hypertension. *Hypertension* **5**, 603-609 (1983).
35. Margolius, H. S., Chao, J. and Kaizu, T.: The effects of aldosterone and spironolactone on renal kallikrein in the rat. *Clin. Sci. Mol. Med.* **51** (Suppl), 279s-282s (1976).
36. 吉田 尚: 今日の内分泌臨床(副腎). *ホルモンと臨床* **35**, 401-410 (1987).
-
- 別刷請求先:
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学内科学第2講座 美田晃章