

## ●原 著

## 高圧酸素の高血圧自然発症ラットにおける血管タンパク質代謝および尿中カリクレイン排泄量に与える影響

中田 英浩\* 片山 喬\* 斉藤 春雄\*\*  
 太田 幸吉\*\* 三枝 俊夫\*\* 千見寺 勝\*\*  
 松下 徳良\*\* 樋口 道雄\*\*\*

**Effect of hyperbaric oxygenation on vascular protein and urinary kallikrein excretion of stroke-prone and -resistant spontaneously hypertensive rats**

Teruhiro Nakada\* Takashi Katayama\* Haruo Saito\*\* Kokichi Ota\*\* Toshio Saegusa\*\* Masaru Chikenji\*\* Noriyoshi Matsushita\*\*, and Michio Higuchi\*\*\*

\*Department of Urology, Faculty of Medicine, Toyama Medical & Pharmaceutical University, Toyama, Japan. \*\*Hyperbaric Oxygenation Institute, Saito Rosai Hospital, Chiba, Japan. \*\*\*Division of Central Surgery Clinic, Chiba University, School of Medicine, Chiba, Japan.

Increased incorporation of <sup>3</sup>H-lysine into the non-collagenous protein of mesenteric arteries was observed in genetically hypertensive rats. Urinary kallikrein excretion of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) was slightly lower ( $p < 0.05$ ) than that of the Wistar Kyoto rats (WKY), but this enzyme activity in urine was similar between spontaneously hypertensive rats (SHR) and WKY. Enhanced incorporation of tritiated lysine in genetically hypertensive rats was reduced by the treatment with hyperbaric oxygen (OHP) 90 minutes daily from 6 weeks of age to 13 weeks of age. Such OHP-treatment increased urinary kallikrein excretion of SHR and SHRSP ( $p < 0.05$ - $p < 0.001$ ), but failed to suppress the development of hypertension. It is suggested some unknown factors except increased vascular non-collagenous protein metabolism and elevated urinary kallikrein excretion plays an important role

to maintain hypertension in severe hypertensive stage of these genetically hypertensive rats.

## 緒 言

従来、高圧酸素療法は diving medicine を主たる対照に行われてきたが、近年、多くの分野において臨床応用が試みられている。著者らは高圧酸素を利用して副腎皮質機能を亢進させることにより副腎皮質ステロイドの離脱が困難であった症例に、離脱が可能とさせることに成功した<sup>1)</sup>。また高圧酸素の下垂体、睪丸への影響についても検討した<sup>2)</sup>。本治療法は今後ますます適応範囲を広げる可能性が大きい、その vasoactive substance に与える影響についてはほとんど研究されていない。著者らは高血圧動物を中心として、その血圧、血行動態に重要な役割を果していると推測されている血管タンパク質代謝、尿中カリクレイン排泄量について検討を行い、2、3の知見を得たので、その一部を報告する。

## 実験対象および方法

対象は30匹のウィスター京都ラット (WKY)、31匹の高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rat, SHR)、31匹の脳卒中易発症ラット (stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHRSP) で、いずれも雄性ラットである。これらの動物を生後6週より13週に至るまで週に1

## Keywords

カリクレイン  
 non-collagenous protein  
 高血圧自然発症ラット  
 高圧酸素

\*富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

\*\*斉藤 災病院

\*\*\*千葉大学医学部中央手術部

回, pulse pick up method により収縮期血圧を測定し, 1日90分, 以下のごとき処置を連日, 行った。すなわち, 第I群は第II, 三群と同様, 高圧酸素室に搬入したが, 高圧酸素(OHP)処置を加えず, 第II群は30~35%の酸素混入下で絶対圧2気圧(2 ATA)にて加圧した。第III群は大気環境下にて2 ATA 処置を行った。すべてのラットは生後81日目より24時間尿をプラスチック容器に採取したのち, 第13週令にて $^3\text{H}$ -lysine[L-lysine 4, 5- $^3\text{H}$ (N), M. W. 146.2, specific activity = 50.0 Ci/mmmole, New England Nuclear Corp., Boston, Mass.]  $0.4 \mu\text{Ci/g}$  体重を尾静脈より注入し, 2時間後に断頭屠殺した。駆幹血はただちに遠沈して血清とし $-40^\circ\text{C}$ にて凍結保存した。まず心臓を摘除し, ついで大動脈弓, 上行大動脈ならびに胸部大動脈の右腎動脈分岐までの高さを一塊として摘除し, 最後に腸間膜動脈を根部より末梢に至るまで摘除した。これらの臓器は附着した結合織を除去し, 心臓および大動脈の内腔および外壁, さらに腸間膜動脈外壁を生理食塩水にて洗滌し, 凝血を除去した。これらの諸臓器は5%トリクロル醋酸(TCA)でホモジェネートし,  $90^\circ\text{C}$ にて30分間加熱し, その沈渣を同様の熱処理で同時間行った後, 遠心沈殿し, さらに5% TCA にて2回洗滌した。遠心沈殿後の沈渣は0.1 N NaOH で洗滌して $90\sim 95^\circ\text{C}$ にて加熱した。この suspended mix-

ture を pH7.0 に調整し, 24時間室温( $20\sim 22^\circ\text{C}$ )に放置後, 755 g にて15分間遠心沈殿して不溶物(elastin)を除去した。supernatant fraction に ice bath 中にてその1/10量の50% TCA を加え, 2,420 g にて30分間冷却遠心沈殿した。得られた non-collagenous protein は5% TCA にてさらに2回加熱洗滌した後, アセトン, ついでエタノールにて洗滌し,  $55^\circ\text{C}$ にて乾燥した<sup>3)</sup>。これを tissue solubilizer にて溶解し, 1部をタンパク質濃度の測定(Lowry法<sup>4)</sup>)に用い, 他は counting solution を加えてその radioactivity をシンチレーションカウンターにて測定した。本手技の詳細はすでに報告してある<sup>5)~10)</sup>。

尿中カリクレイン排泄量は Beaven らにより作製され, Imanari ら<sup>12)</sup>, Margolius ら<sup>13)</sup>により modify された radiochemical method により測定した。その概略は以下のごとくである。0.2 M Tris-HCl buffer に gelfiltrated 尿を混じ, さらに 0.01 M  $^3\text{H}$ -TAMe p-tosyl-arginine  $^3\text{H}$ -methyl-ester ( $^3\text{H}$ -TAMe) (specific activity = 57 mC/mmol, New Engl Nucl.)を加える。これらをプラスチックの試験管内で混合してから toluene-base cocktail (toluene: scintillation cocktail = 2.4: 1)および stop solution (0.02 M TAMe, 50% dimethylformamide, 10%氷醋酸)の入った counting vial に移し, 30分間 incubate してから,

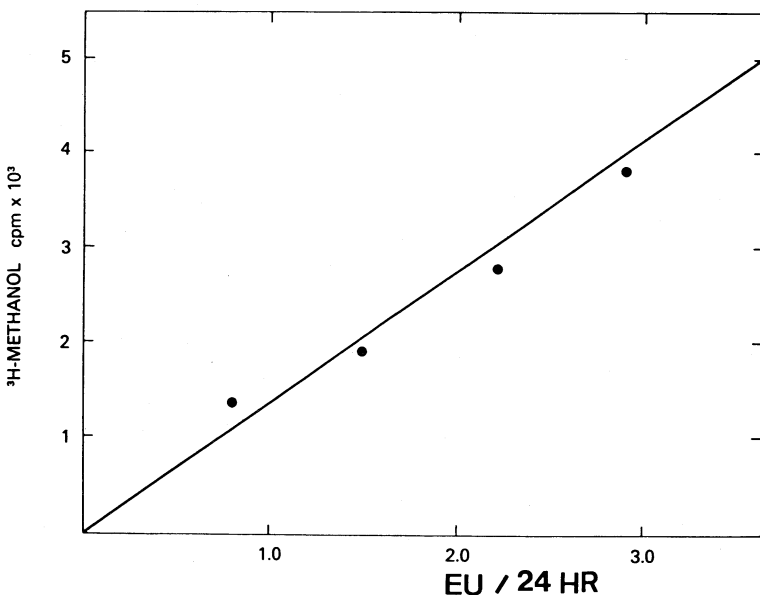


Fig. 1. The specific activity of a human urinary kallikrein determined by the curve. Each solid circle represents partially purified urinary kallikrein.

counting vial を振盪した。この反応液の radioactivity をシンシレーションカウンターにて測定した。なお partially purified human urinary kallikrein (38-190 m units/ml) を用いて標準線を作製し (Fig. 1), esterase unit (EU) にて表わした。

## 成 績

Fig. 2 に示すごとく, WKY の血圧はきわめて緩やかに6週令より13週令にかけて上昇するにすぎないが, SHR, SHRSP のそれは加齢とともに急激に上昇する。OHP 処置は, 酸素を加えても (第II群), 加えなくても (第III群) 血圧の上昇は抑制できない。 $^3\text{H}$ -lysine の血清濃度は第I群で  $1,089 \pm 64$ , 第II群で  $1,140 \pm 91$ , 第III群で  $1,121 \pm 76$  dpm/ml plasma (各, mean  $\pm$  S.E.) であり, 3群間に有意差はない。心臓の non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みは (Fig. 3) WKY, SHR, SHRSP 間で有意差はなく, いずれの OHP 処置を行っても有意の変化は生じなかった。大動脈においては (Fig. 4), WKY に比し SHR の本臓器への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みが, 軽度 ( $p < 0.05$ ) 増加していた。第III群の SHR の大動脈の non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みは第I群の SHR のそれより有意に ( $p < 0.05$ ) 低い。また第II群の SHRSP の大動脈

の non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みは第I群の SHRSP のそれより有意に ( $p < 0.05$ ) 低い。腸間膜動脈の non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みは (Fig. 5), SHR では WKY より1.3倍 ( $p < 0.05$ ), SHRSP では WKY より1.5倍 ( $p < 0.001$ ) それぞれ高値である。これらの動物に OHP 処置を行うと, WKY ではほとんど影響を受けないが, SHR においては大気下での OHP 処置により (第III群) 有意に ( $p < 0.001$ ), non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みが減少する。高濃度酸素下の SHR でもさらに ( $p < 0.01$ ) 減少が著しい (第II群)。SHRSP においてもほぼ SHR と同様, 酸素を saturation してもしなくても OHP 処置により,  $^3\text{H}$ -lysine の腸間膜動脈の non-collagenous protein への取り込みが著しく ( $p < 0.01$ ) 減少した。

尿中カリクレイン排泄量は Fig. 6 に示すごとく, 無処置ラットでは SHR と WKY はほぼ同レベルであり, SHRSP は WKY よりやや ( $p < 0.05$ ) 低値を示した。OHP 処置は WKY の尿中カリクレイン処置に何らの影響を及ぼさなかった。SHR においては第II群, 第III群の SHR の尿中カリクレイン排泄量は第I群のそれよりそれぞれ有意に (各,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ) 高値を示した。SHRSP においては第II群, 第III群の尿中カリク

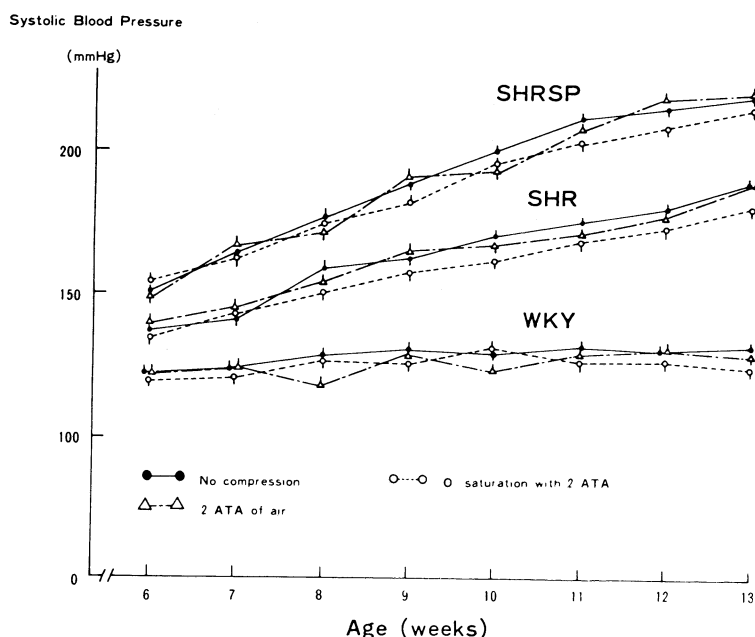


Fig. 2. Variation of systolic blood pressure in WKY, SHR and SHRSP treated from 6 weeks of age to 13 weeks of age with 2 ATA of air or oxygen saturation with 2 ATA. See detail in the text. Each bar represents the S. E. M.

レイン排泄量は第 I 群のそれよりそれぞれ有意に ( $p < 0.001$ ) 高値を示した。

### 考 察

高血圧自然発症ラットにおいて、血管収縮と関連深いと考えられている non-collagenous protein 代謝の亢進が、血圧上昇のトリガーとなることが報告されている<sup>5)6)</sup>。しかし SHR に hydralazine を投与すると、血圧は下降するが、主として小動脈の non-collagenous protein 代謝はほとんど不変であることも知られている<sup>9)</sup>。本実験においては OHP 処置が高血圧動物の血圧に大きな変化を与えず、腸間膜動脈の non-collagenous pro-

tein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みを減少させた。これは高血圧自然発症ラット、脳卒中易発症ラットでは、高血圧がすでに establish された時期には、non-collagenous protein のみでなく、他の昇圧系、降圧系も高血圧の発症またはその維持に関与することを示唆している。尿カリクレインは腎カリクレインと同一の由来をもつと、今日、みなされており<sup>13)</sup>、その降圧作用が注目されている。すなわち、カリクレイン (降圧系) の減少が昇圧を来たすとの見解が、一部の研究者により報告されている<sup>14)</sup>。著者らは mild な降圧作用を示すカリクレインに、高血圧の病因のすべてを帰すことに反対であるが<sup>15)</sup>、OHP 処置により高血圧動物の尿中カ

### INCORPORATION OF $^3\text{H}$ -LYSINE INTO NON-COLLAGENOUS PROTEIN OF HEART

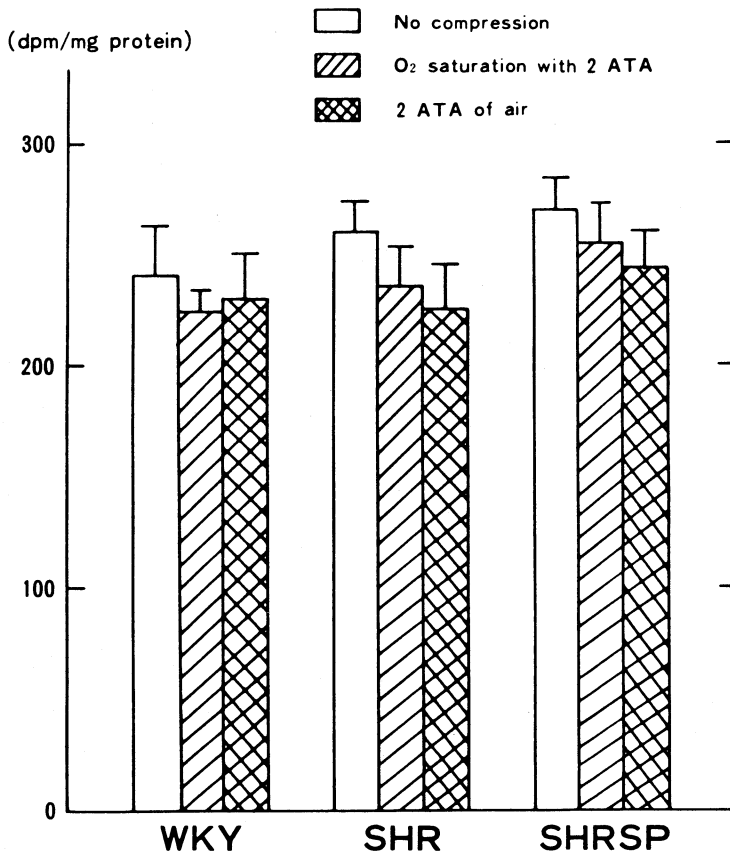


Fig. 3. Incorporation of  $^3\text{H}$ -lysine into non-collagenous protein of heart of rats. Each column with vertical bar represents mean + S. E.

リクレイン排泄量が増加した事実は興味深い。Ooshima ら<sup>16)</sup>は collagen 代謝の亢進を SHR の昇圧に重要な役割を果たすと考えており、著者らも副腎再生性高血圧ラットにおいて collagen 代謝の亢進が高血圧の病因の1つとして主要な役割を果たしており、腎血管性高血圧動物においても慢性期においては non-collagenous protein 代謝のみならず、collagen 代謝の亢進が小動脈において認められたことを報告した<sup>9)17)</sup>。collagen は安定した結合繊維タンパクであり、血管壁に collagen が増殖すると血管壁の肥厚が生じるから non-collagenous protein 代謝が多少抑制されても血圧の

上昇は惹起されるのかもしれない。またこれらの高血圧動物では未知の vasoactive substance が昇圧に関与している可能性もあり、いくつかの昇圧系、降圧系が互いに影響し合って血圧が上昇している可能性も当然ある<sup>18)</sup>。

OHP 療法は wound healing, ある種の血管病変に対して有効であることが知られており、麻痺性イレウスの治療にも用いられている<sup>19)</sup>。しかしながら、CNS, vasoactive substance への影響はほとんど解明されておらず、内分泌臓器への影響も追究されはじめたばかりである。OHP の臨床応用をより安全に、効果的に行うためにも、これ

INCORPORATION OF <sup>3</sup>H-LYSINE  
INTO NON-COLLAGENOUS PROTEIN  
OF AORTA

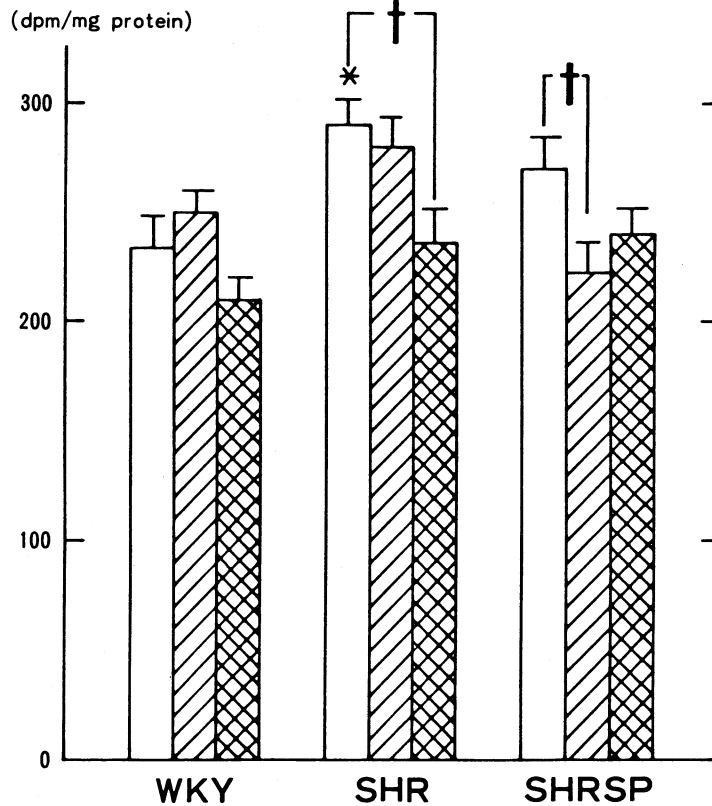


Fig. 4. Incorporation of <sup>3</sup>H-lysine into non-collagenous protein of aorta of rats. Schematic representation as in Fig.3. Significantly different from WKY receiving same OHP treatment; \*p<0.05 Significantly different from control rats in each strain: +p<0.05

らの検索が必要と思われる。

### 結 語

正常血圧である WKY, 高血圧自然発症ラット (SHR), 脳卒中易発症ラット (SHRSP) に第 6 週令より第 13 週令にかけて絶対圧 2 気圧の OHP

処置を連日, 1 日 90 分施行し,  $^3\text{H}$ -lysine の心臓, 大動脈, 腸間膜動脈の non-collagenous protein への取り込みを測定するとともに尿中カリクレイン排泄量を測定した。WKY の腸間膜動脈の non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine のとり込み に比し, SHR, SHRSP のそれはそれぞれ有意に

#### INCORPORATION OF $^3\text{H}$ -LYSINE INTO NON-COLLAGENOUS PROTEIN OF MESENTERIC ARTERY

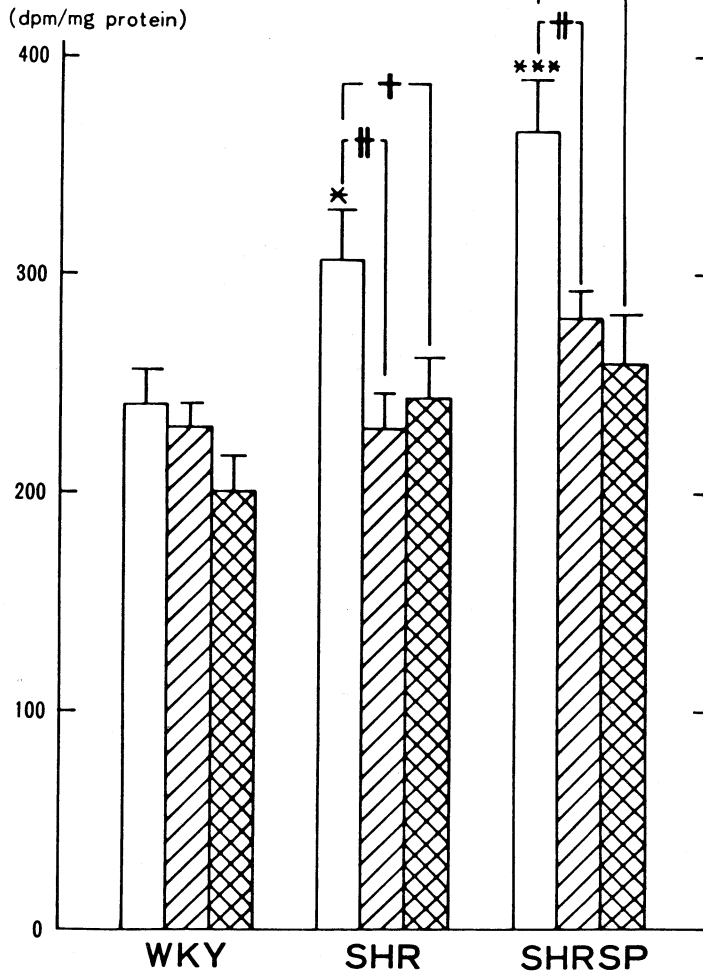


Fig. 5. Incorporation of  $^3\text{H}$ -lysine into non-collagenous protein of mesenteric arteries of rats. Schematic representation as in Fig. 3.

Significantly different from WKY receiving same OHP treatment: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Significantly different from control rats in each strain: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )高値であった。OHP 処置は SHR, SHRSP の主として小動脈の non-collagenous protein への  $^3\text{H}$ -lysine の取り込みを有意に ( $p < 0.05 - p < 0.01$ ) 減少させた。SHRSP の尿中カリクレイン排泄量は WKY のそれより軽度 ( $p < 0.05$ ) 低値であったが, SHR のそれは WKY のカリクレイン値と有意差はなかった。OHP 処置は SHR, SHRSP の尿中カリクレイン排泄量を有意に ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) 上昇させた。しかしながらどのラットでも血圧は OHP の影響を受けなかった。

以上の成績より, OHP は高血圧動物の小動脈の non-collagenous protein 代謝を低下させ, 尿中カリクレイン排泄量を上昇させる。しかし血圧に対しては何らの影響を及ぼさず, 高血圧動物において, 高血圧が確立された時期には non-collagenous protein 代謝, 尿中カリクレイン以外の因子が昇圧に関与することが推測される。

本研究の 1 部は科学研究費補助金の助成を受け

た。ここに深謝する。

#### 〔参考文献〕

- 1) Nakada, T., Tateno, Y., Hattori, Y., Momose, G., Saito, H., Ota, K. and Saegusa, T.: On release from steroid-dependency by hyperbaric oxygenation. *Chiba Med. J.*, 50, 363-371, 1974.
- 2) Nakada, T., Ota, K., Saegusa, T. and Saito, H.: The influence of hyperbaric oxygenation on rat testes. *Invest. Urol.*, 14, 93-94, 1976.
- 3) Skosey, J.L., Zak, R., Martin, A. F., Aschenprenner, V. and Rabinowitz, M.: Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. V. Labeling of collagen, myosin, and nuclear DNA during experimental myocardial hypertrophy in the rat. *Circ. Res.*, 31, 145-157, 1972.
- 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- 5) Yamori, Y., Nakada, T. and Lovenberg, W.: Effect of antihypertensive therapy on lysine incorporation into vascular protein of the

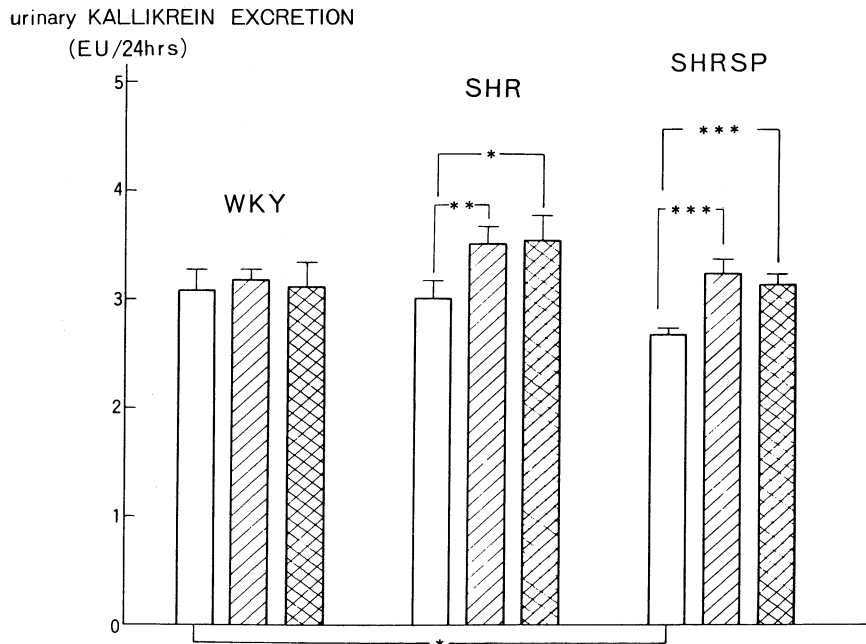


Fig. 6. Urinary kallikrein excretion (EU/day) in WKY, SHR and SHRSP.

Schematic representation as in Fig. 3.

Significance of differences from paired comparisons: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

- spontaneously hypertensive rats. *Europ. J. Pharmacol.*, 38, 349-355, 1976.
- 6) Nakada, T. and Lovenberg, W.: Lysine incorporation in vessels of spontaneously hypertensive rats: effects of adrenergic drugs. *Europ. J. Pharmacol.*, 46, 87-96, 1978.
  - 7) Nakada, T., Katayama, T. and Shimazaki, J.: Suppression of  $^3\text{H}$ -lysine incorporation into the vascular non-collagenous protein in rats treated with estradiol-17 $\beta$ . *Europ. J. Pharmacol.*, 59, 31-36, 1979.
  - 8) Nakada, T. and Yamori, Y.: The role of vascular protein and renin in chronic two-kidney, one clip Goldblatt hypertension. *Clin. Exptl. Hypertension*, A4(3), 477-497, 1982.
  - 9) Nakada, T., Shigematsu, H. and Lovenberg, W.: Testicular tissue injury of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat associated with increased protein synthesis in the testicular arteries. *Jpn. J. Fert. Steril.*, 27, 148-155, 1982.
  - 10) Nakada, T., Shigematsu, H. and Lovenberg, W.: Increased incorporation into protein of the internal spermatic and testicular arteries of the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Heart J.*, 20(sup. 1), 246-248, 1979.
  - 11) Beaven, V. H., Pierce, J. V. and Pisano, J. J.: A sensitive isotopic procedure for the assay of esterase activity; measurement of human urinary kallikrein. *Clin. Chim. Acta*, 32, 67-73, 1971.
  - 12) Imanari, T., Pisano, J. J. and Pierce, J. V.: Radiochemical assay of human plasma prekallikrein. *Fed. Proc.*, 32, 846(Abs.), 1973.
  - 13) Levinsky, N. G.: The renal kallikrein-kinin system. *Circ. Res.*, 44, 441-451, 1979.
  - 14) Margolius, H. S., Horwitz, D., Pisano, J. J. and Keiser, H. R.: Urinary kallikrein excretion in hypertensive man. Relationships to sodium intake and sodium-retaining steroids. *Circ. Res.*, 35, 820-825, 1974.
  - 15) Nakada, T., Yamori, Y. and Bartter, F. C.: Effects of altered dietary sodium and deoxycorticosterone acetate on plasma prekallikrein in rats with special reference to hypertension. *Jpn. Circ. J.*, 43, 385-393, 1979.
  - 16) Ooshima, A., Fuller, G. C., Cardinale, G. J., Spector, S. and Udenfriend, S.: Increased collagen synthesis in blood vessels of hypertensive rats and its reversal by antihypertensive agents. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 3019-3023, 1974.
  - 17) 中田英浩, 山崎典昌, 秋谷徹, 片山喬: 副腎再生高血圧症—その昇圧因子, 降圧因子の検討と再生副腎の他臓器に与える影響について—, *西日本泌尿*, 42, 937-943, 1980.
  - 18) 中田英浩, 片山喬: 高血圧自然発症ラットの vasocactive substance. *最新医学*, 35, 1476-1483, 1980.
  - 19) Saito, H., Ota, K., Saegusa, T., Chikenji, M., Oka, Y., Higuchi, M., Nakada, T., Ogata, H., Shibata, C., Yoshihara, I., Noguchi, T. and Okui, K.: Clinical and experimental studies of OHP treatment on postoperative ileus. *Proc. 6th. Int. Cong. on Hyperbaric Med.* (ed. G. Smith), Aberdeen University Press, pp. 333-337, 1979.