

大量のカリクレインおよびブラディキニンの 腎の凝固・線維素溶解酵素系に及ぼす影響

東京女子医科大学泌尿器科学教室 (主任：梅津隆子教授)

増 田 聡 子
マ ス タ ヲ

(受付 昭和49年4月4日)

The Effects of High Dose of Kallikrein and Bradykinin on the Clotting and Fibrinolytic Systems in the Kidney of Rabbit

Satoko MASUDA, M.D.

Department of Urology (Director: Prof. Ryuko UMETSU)
Tokyo Women's Medical College

The effects of high dose kallikrein and bradykinin as a shock stimulant on the clotting and fibrinolytic systems in the renal tissue and blood were studied.

The male rabbits weighing 3 kg were used and divided into two groups.

One group was given intravenously 40 units of kallikrein, another group 250 γ of bradykinin respectively.

Results were as followed:

(1) All of rabbits showed anaphylactoid signs for a few minutes immediately after injections of each drug.

(2) Renal blood flow markedly increased immediately after kallikrein administration and returned to pre-treatment values and then exceeded them slightly, however, finally returned to pre-treatment (control) values gradually. On the other hand, they did not returned to pre-treatment values in the case of bradykinin injections.

(3) The clotting and fibrinolytic activities in the renal venous blood markedly increased immediately after injections of each drug, but returned to pre-treatment values after 10 minutes. These activities in the renal venous blood were higher than that of auricular venous blood.

(4) Thromboplastin like substances (TTLS) in the renal tissues increased after administration of each drug with either Astrup method or Quick method, but there were wide variation of values in the medullar tissue. Astrup method was more preferable to estimate TTLS than Quick method, because the former could get constant values and had reproducibility.

(5) Fibrinolytic activities were almost not observed in the cortical tissues and not activated with kallikrein or bradykinin administrations, while they were observed in the medullar tissues and activated with each drug, revealing higher activities at 10 minutes after injections than that of 2 minutes.

目 次

- I. はじめに
- II. 実験準備
- III. 実験方法
- IV. 測定項目ならびに測定方法
 - 1. 腎血流量
 - 2. 腎静脈血の凝固・線溶能
 - 3. 腎の T.T.L.S. (Tissue thromboplastin like substance)
 - 4. 腎組織線溶能
- V. 実験成績
 - 1. 一般的観察
 - 2. 腎血流量
 - 3. 腎静脈血の凝固・線溶能
 - 4. 腎の T.T.L.S.
 - 5. 腎組織の線維素溶解酵素系
- VI. 総括ならびに考按
- VII. まとめ
- 参考文献

I. はじめに

キニン遊離系が線維素溶解酵素系(以下線溶系と略称する)や血液凝固系と関連することは周知である。

ちなみに、キニン遊離にあずかる生体内の反応系としては、1) Hageman 因子によつて活性化されるキニン系¹⁾²⁾⁸⁾、2) プラスミンの関与するキニン系⁴⁾⁵⁾、3) 組織のキニン系、4) トリプシンによつて活性化されるキニン系⁶⁾が示されている¹⁾。

すなわち、Hageman 因子をとりあげても、Hageman 因子は、カリクレイン-キニン系、線溶系、血液凝固系のいずれの系においても引き金的役割をなしており、これら3系は互いに関連しつつ生体、とくに血液のホメオスタシス維持に関与しているといえる。

一方、各種ショックの病態生理を説明する場として、血液の rheology との関連における播種性血管内凝固症候群 disseminated intravascular coagulation(DIC)や血管動態、さらに血管周囲の問題からも考究される⁷⁾。

ここに、vasoactive peptide としての(カリクレイン-)キニン系は、ショック惹起因子の一つ

として当然考慮されることにもなる。ウサギに大量のブラディキニンを投与した場合の、主として血尿を対象とした尿の変化と、腎組織、血液や尿の線溶系を検索した報告はある⁸⁾。

著者は、大量のカリクレインならびにブラディキニンの全身投与による代表的ショック臓器である腎の血流と血液ならびに組織の線溶系と凝固系の変動をみて、いささか知見をえたので報告する。

II. 実験準備

1. 実験動物：体重3 kg前後の成熟雄性ウサギを使用した。
2. ブラディキニン：ユーザイ K.K. より提供のブラディキニン粉末を使用、その都度滅菌蒸溜水にて12.5 γ /ml に調製した。
3. カリクレイン：Kallikrein®(バイエル社製)40生物学的単位を生理的食塩水で2生物学的単位/ml に調製した。
4. 補液：リンゲル液使用。
5. プラスミン：Fibrinolysin®(ミドリ十字社製 UK-PL, 1バイアル中125単位)を滅菌蒸溜水で5単位/ml に調製した。
6. ウロキナーゼ：Urokinase®(ミドリ十字社製, 1バイアル中100単位)を滅菌生理食塩水で20単位/ml に調製した。
7. トロンビン：局所用トロンビン(持田製薬製, 1バイアル中500単位)を滅菌生理食塩水で20単位/ml に調製した。
8. フィブリノーゲン：Bovine Fibrinogen®(Armour pharmaceutical Company 製)。
9. CaCl₂ は $1/40$ M を使用。
10. リン酸緩衝液。
11. 血漿(ヒト血漿, ウサギ血漿)：3.8%クエン酸ソーダー1容に対して9容採血した。なお、それぞれの血漿を分離後、常に3検体以上を混和して使用した。
12. Astrup 法による組織トロンボプラスチン様物質(以下T T L S と略称する)測定については、採血用の注射器をはじめ、器具はすべてシリコン処理したものをを用いた。

III. 実験方法

ウサギを腹臥位に固定し、耳静脈より21ゲージ注射針を用い、平均30滴/分の速度で点滴を確保した。

- 2) まず点滴と反対側の耳静脈よりコントロールの採

血をした。

3) 次いで1%塩酸プロカインによる局麻下に、第12肋骨下縁より、旁脊柱切開を加えて、後腹膜腔に達し腎を露出した。

4) そしてコントロールとして、片側腎を摘出し、創は閉鎖した。

5) その後、背臥位とし、同様局麻下に腹部正中切開を加え、右大腿静脈より内径1mmのシリコンカニューレを挿入し、下大静脈を経て残存腎静脈に到達させた。

6) 腎血流量の測定、ならびに諸検査用の採血はこのカニューレより経時的に行なつた。

7) カリクイン投与群ではカリクレイン40生物学的単位を、ブラディキニン投与群ではブラディキニン250 γ を1分間かけて、それぞれ点滴の側管より管注した。

8) 静注2分後と10分後に腎茎に止血鉗子をかけて血流を遮断後、腎を摘出した。摘出された腎は、直ちに生食水20ml(常温)を21ゲージ注射針を用いて腎動脈より10ml/分の速度で灌流した。この際、腎静脈より流出する灌流液が透明になり、かつ摘出腎表面の虚血性変化の確認によつて灌流を終了した。その後腎を皮質と髓質に分離後、検査時まで滅菌シャーレに置いて、冷蔵庫内に保存した。

IV. 測定項目ならびに測定方法

1. 腎血流量

先述した如く、右大腿静脈より下大静脈を経て腎静脈に到達せしめた内径1mmのシリコンカニューレよりの血流量を測定した。そして、カリクレイン投与群、ブラディキニン投与群ともに、両薬剤を1分間かけて注入後、1分より経時的に10分までの尿流量を毎分測定した。

2. 腎静脈血の凝固・線溶能

全血使用線溶簡易測定法⁹⁾に従った。すなわち、採取直後の全血3滴(約0.1ml)を管壁につかぬよう予め準備した磷酸緩衝液0.5ml入り凝集管に落して振盪する。次いで、5単位/mlプラスミン0.1mlを加えると同時にストップウォッチを始動し、再度振盪混和後37°C恒温槽中で凝固時間及び溶解時間を測定した。

3. 腎の組織トロンボプラスチン様物質

(Tissue Thromboplastinlike Substance; TTLS)

A) Quick 法

Quickの組織トロンボプラスチン精製法に準じ、その活性はプロトロンビン時間(またはトロンボプラスチン時間)測定法(一般法)に準じて測定した¹⁰⁾¹¹⁾。

(1) 組織トロンボプラスチンの精製法:

灌流後の各組織片を秤量(wet weight)後、乳鉢中で

これを磨碎し、その後10mlのアセトンを加えながら更に磨碎して、組織をアセトンの中に浮遊させる。もろもろになつた浮遊液を3,000rpmで10分間遠心分離し、上清を捨て、沈渣の約5倍量のアセトンを注ぎ、硝子棒で沈渣を攪拌して振盪混和する。これを再び遠心分離し、前と同様に上清を捨てて新しいアセトンを注ぐ。この操作を5回反復後、沈渣をシャーレに移し、デシケーターを用いて一昼夜乾燥させる。十分乾燥すると、淡黄色、不定型の粉末ないし小粒子が得られる。この組織粉末200mgを5mlの生理食塩水に浮遊させ、45°C~50°Cで15~20分加温する。この浮遊液の綿花による濾液を組織トロンボプラスチン様液100%とした。

(2) トロンボプラスチン様物質活性の測定法:

組織トロンボプラスチン様物質活性の測定は、プロトロンビン時間測定法(Quick一段法)によつた。先述の如く、健康成人3例以上の静脈血漿を混和したものをを用いた。

この血漿0.1mlを内径10mmの小試験管に移し、該組織トロンボプラスチン様液0.1mlを加えて混和後、数秒間恒温槽(37°C)で加温した。その後、1/40M塩化カルシウム液0.1mlを加え、その瞬間にストップウォッチを始動させ、試験管を速やかに軽く振盪してから白色のフィブリンが析出するまでの時間を測定した。この測定は一つの検体につき少なくとも3回行ない、その平均値をとつた。なお組織トロンボプラスチン様液は生理食塩水を用いて、75%、50%、25%に希釈したものについても測定した。測定値は、組織トロンボプラスチン様液の代りに生理食塩水0.1ml使用しフィブリン析出時間を100として補正した。

B) Astrup 法¹²⁾

(1) 組織トロンボプラスチン様液の精製法: 灌流した腎組織を同様に皮質と髓質に分け、それぞれ200mgの組織に対して生理食塩水1.8mlを加えてPotterホモジナイザーでホモジナイズする。そして、この懸濁液は-20°Cで、数日間凍結し、その後、融解させ、再びホモジナイズした後、青梅綿での濾液を組織トロンボプラスチン様液(100%)とした。

すなわち、Astrupらはこの凍結、融解によつて、細胞からトロンボプラスチン活性物質が遊離するという。

(2) 組織トロンボプラスチン様物質活性の測定法: 先述の如く、3匹以上の健康成熟ウサギより、シリコン処理注射器で採血したクエン酸血漿を混和したものを使用した。この血漿0.2mlを内径10mmのシリコン処理試験管に入れ、0.5mlの生理的食塩水、0.1ml組織トロ

ンボプラスチン様液を加えて振盪後、37°Cの恒温槽で3分間加温する。その後、0.2mlの1/40M塩化カルシウム溶液を加えてストップウォッチを始動させ、同様にして白色のフィブリンが析出するまでの時間を測定した。なお、組織トロンボプラスチン様液は生理食塩水で、75%、50%、25%に希釈したものについても測定した。測定は、各検体について3回行ない平均値を求め、組織トロンボプラスチン様液の代りに生理的食塩水0.2mlを使用したフィブリン析出時間を100として表現した。なお、Astrupが指摘する新鮮ヒト脳の懸濁液の活性との比較については省略した。

4. 腎組織線溶性

Astrupの標準フィブリン平板法で測定を行なった。標準フィブリン平板はPetriシャーレにpH6.4 Borate-saline bufferによる0.1%フィブリノーゲン溶液の8mlを流し、生理食塩水で10単位/mlとしたトロンビン溶液4mlを加えてフィブリン平板を作製した。そして平板を作製してから30分後にはじめて使用した。検体は灌流後の摘出腎組織の皮質と髄質を別個に、約1.5mm³の組織切片として、そのまま標準フィブリン平板上におき、37°C孵卵器で18時間放置後の溶解面積で表わした。測定値は10単位/mlウロキナーゼ0.03mlの溶解面積で補正した。

V. 実験成績

1. 一般的観察

体重約3kgの成熟ウサギにカリクレイン40生物学的単位を1分間で静注すると、静注終了直後に、号泣、流涙、全身痙攣、後弓反張、頻脈、呼吸促進が観察され、中には糞尿の失禁がみられる

が、これらの現象は2~3分後には平常に戻る。

ブラディキニン250γ静注ウサギにおいても同様に、静注終了と同時に号泣、流涙、全身痙攣、後弓反張、頻脈、呼吸促進が観察されたが、カリクレイン40単位群に比較すると反応は少し弱いように思われ、糞尿の失禁をみたものは少数であった。

2. 腎血流量

1) カリクレイン40単位静注群：

カリクレイン静注により、図1の如く静注終了1分後に腎静脈の環流量は最低を示し、徐々に回復して6分後にはコントロールとほぼ同値になり、10分後にはカリクレイン投与前値よりもわずかながら増量した。

2) ブラディキニン250γ静注群：

カリクレイン同様、図2に示す如く、ブラディキニン注入後、直ちに腎静脈血の環流量の減少を見た。その後時間の経過と共に増加が見られたが、10分後まではブラディキニン投与前の値まで回復しなかつた。

3. 腎静脈血の凝固・線溶性

1) カリクレイン(40単位)静注群

(a) 腎静脈血凝固時間

対照の耳静脈血と腎静脈血との凝固時間をみると、耳静脈血よりも腎静脈血の方が凝固亢進の状態にある。ところで、カリクレイン静注による腎静脈血の凝固時間は、図3の如くで、静注2分後

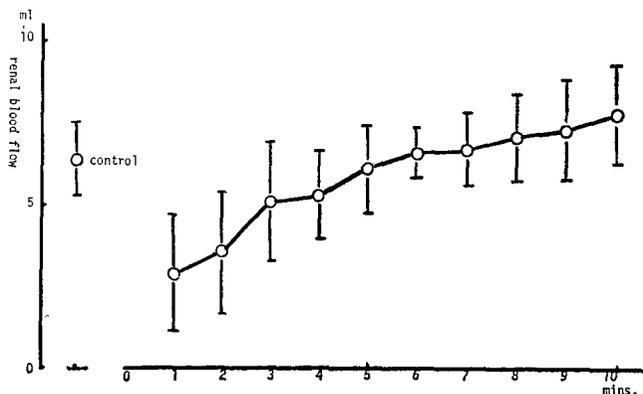


図1 Renal blood flow kallikrein 40u. i.v. inj.

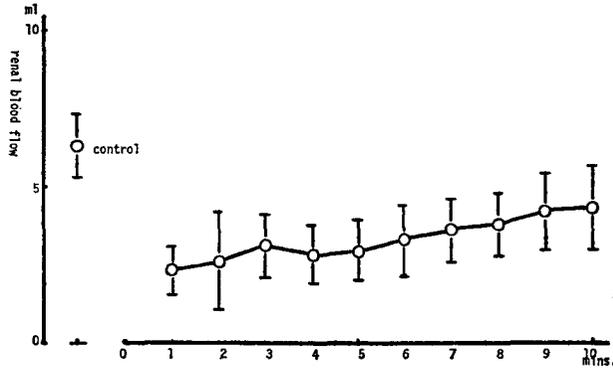


図2 Renal blood flow bradykinin 250 γ i.v. inj.

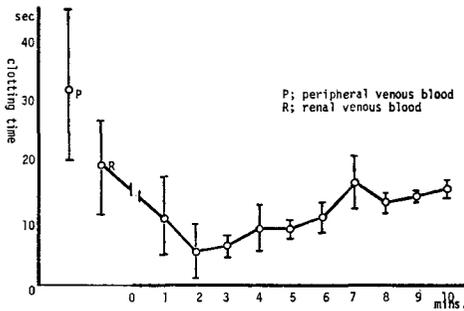


図3 Clotting time of the renal venous blood kallikrein 40u. i.v. inj.

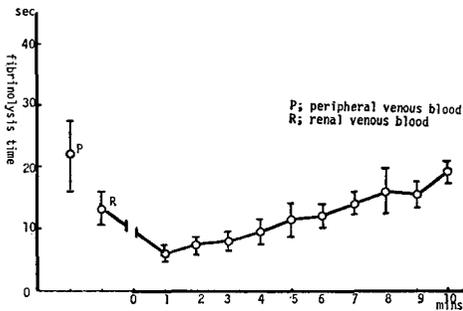


図4 Fibrinolytic activity of the renal venous blood bradykinin 250 γ i.v. inj.

で凝固亢進が最も強く、その後徐々に、この凝固亢進の状態は回復し10分後では静注前の腎静脈血の凝固時間にほぼ近くなった。

(b) 腎静脈血の線溶能

線溶能に関しても、耳静脈血に比して腎静脈血の方が亢進状態にある。カリクレイン40単位静

注、1分後に線溶の著明な亢進がみられ、2分より線溶亢進は徐々に回復し、10分後には静注前の腎静脈血の線溶活性値に回復した(図4)。

2) ブラディキニン 250 γ 静注群

(a) 腎静脈血凝固時間

図5に示す如く、ブラディキニン静注1~2分

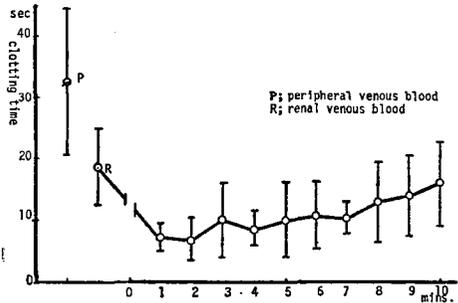


図5 Clotting time of the renal venous blood bradykinin 250 γ i.v. inj.

後に凝固亢進が著しかった。その後徐々に回復を示し、10分後には静注前の腎静脈血の値にほぼ回復した。

(b) 腎静脈血の線溶能

図6の如く、ブラディキニン静注による線溶能は亢進するが、1分後に亢進の最高を示した。2分後より時間の経過と共に回復して、8分後には静注前の腎静脈血の線溶値以上になった。そして10分後には静注前の活性値よりも低下を示した。

小括：体重約3kgの成熟ウサギにカリクレイン40生物学的単位とブラディキニン 250 γ を静注した場合の腎静脈の環流量の変化は、以上の如く

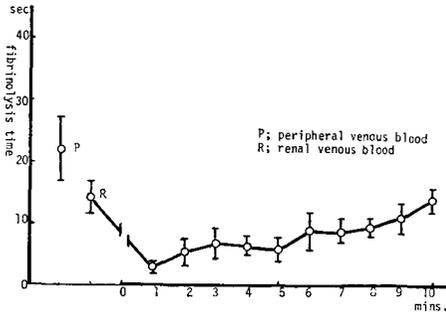


図6 Fibrinolytic activity of the renal venous blood kallikrein 40u. i.v. inj.

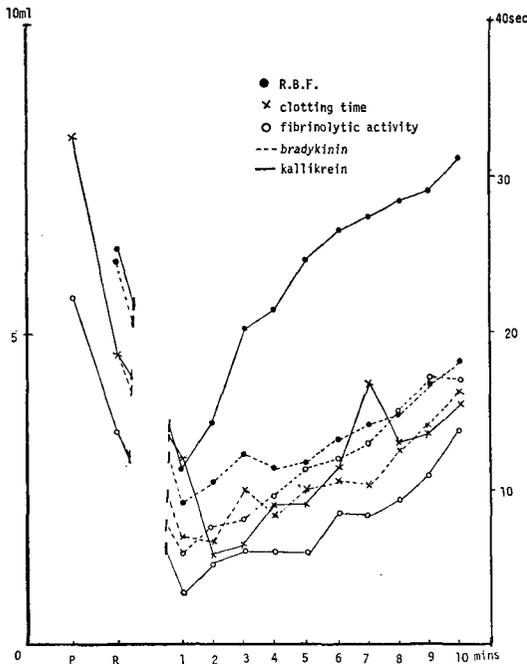


図7 Relation of renal blood flow clotting time and fibrinolytic activity

であつた。これを両者の平均値で比較してみると、図7の如くになり、上記投与量による両薬剤間の変動は、投与直後に著しく減少するが、カリクレイン投与の場合には6~7分経過後に静注前値に戻り、それ以後はむしろ前値よりも増量していたのに対して、ブラディキニン投与群では徐々に増量はするものの、10分後まで前値に復帰しなかつた。

耳静脈血と腎静脈血の線溶能を比較すると、手術による影響は当然考慮すべきではあるが、今回

の検索においても腎静脈血の線溶能が耳静脈血のそれよりも高かつた。

しかるに、先述した条件下の凝固ではあるが耳静脈血よりも腎静脈血の方が凝固時間は短いという興味ある事実が得られた。ところで、腎静脈血の凝固時間の推移をみると、両薬剤投与群ともにはほぼパラレルな変動を示し、静注1分後に凝固能は最も亢進し、2分時より次第に回復を示して、10分後には静注前の凝固時間に近づくことを示した。すなわち、両薬剤間のこの投与量では腎静脈血の凝固系に及ぼす影響はほぼ等しかつた。

腎静脈血の線溶活性も、両群はほぼパラレルな変動を示し、静注1分後に最も著しい線溶亢進を示したが、2分時より次第に回復して、10分時には静注前の線溶活性か、むしろこれよりも活性低下が見られた。しかし線溶の活性化程度は、カリクレイン40生物学的単位投与の方がブラディキニン250 γ 投与よりも強かつた。

腎静脈血の血液凝固に対して、ほぼ同じ影響を与えた40生物学的単位のカリクレインと250 γ のブラディキニンであつたが、腎血流量に関しては前者の影響の方が後者よりも弱かつた。すなわち、response doseの問題はあるがブラディキニンの血圧下降という直接的薬理作用によると解釈されないこともない。

また、線溶活性に対してはカリクレインのプラスミノゲンの活性化が指摘されるが、キニンによる活性化は指摘されておらず、本実験の投与量によつても、ブラディキニンよりも、カリクレインの方がその活性化が強くみられた。

4. 腎の T.T.L.S.

(A) Quick 法

図8, 9の如く、成熟ウサギの正常腎組織には、皮質、髓質ともに凝固促進物質を含み、皮質の方が髓質よりもやや多く含まれるものの如くであつた。

1) カリクレイン40生物学的単位投与群

カリクレインの Quick 法による腎の T.T.L.S. に及ぼす影響は図10, 11, 12, 13の如くであつた。

腎は皮質ではカリクレイン投与により T.T.L.S.

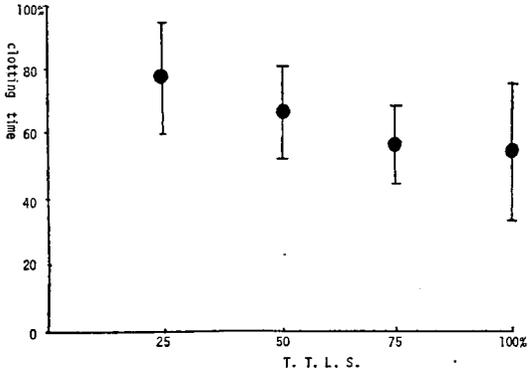


図8 T.T.L.S. by Quick method/Normal medulla

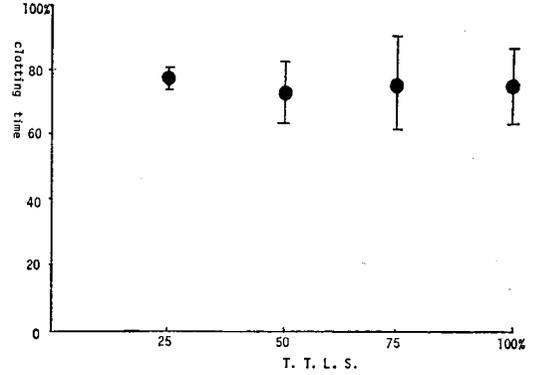


図11 T.T.L.S. by Quick method/Cortex; 2mins after kallikrein inj.

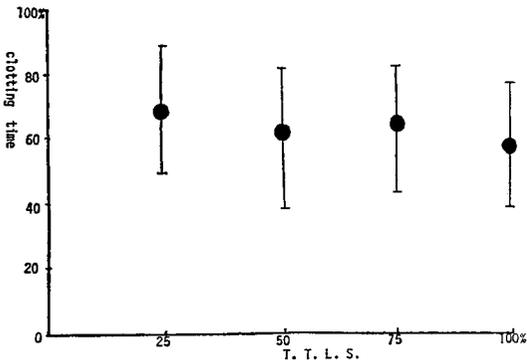


図9 T.T.L.S. by Quick method/Normal cortex

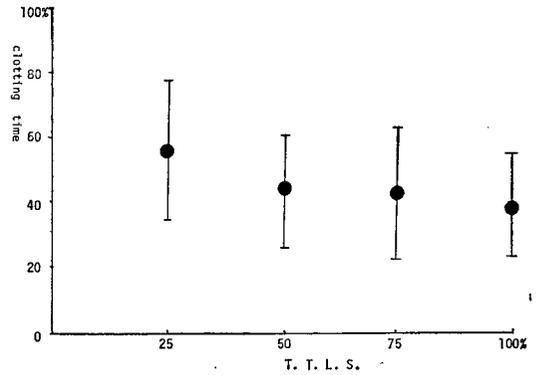


図12 T.T.L.S. by Quick method/Cortex; 10mins after kallikrein inj.

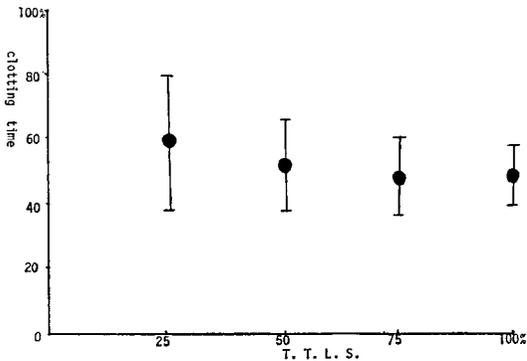


図10 T.T.L.S. by Quick method/Medulla; 2mins after kallikrein inj.

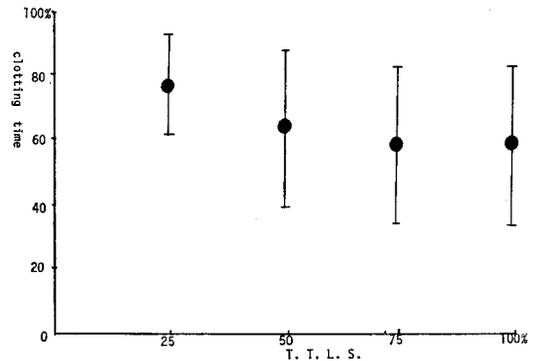


図13 T.T.L.S. by Quick method/Medulla; 10mins after kallikrein inj.

は増量し、しかも、10分時のものの方が2分時のものよりも更に増量していた。腎髄質では、2分時のものはQuick法によるT.T.L.S.はむしろ凝固抑制的に作用し、10分時のものは正常対照とほぼ同じ値を示した。

2) ブラディキニン 250 γ 投与群
 ブラディキニンのQuick法による腎のT.T.L.S.に及ぼす影響は図14, 15, 16, 17の如くであった。

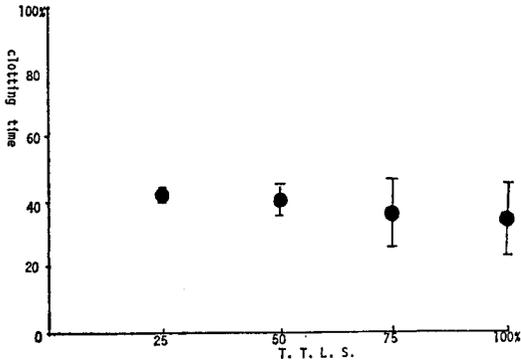


図14 T.T.L.S. by Quick method/Cortex; 2mins after bradykinin inj.

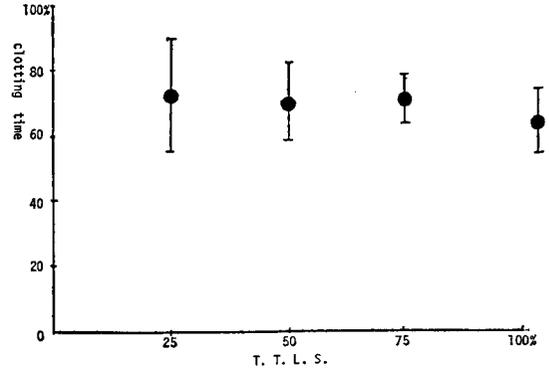


図17 T.T.L.S. by Quick method/Medulla; 10mins after bradykinin inj.

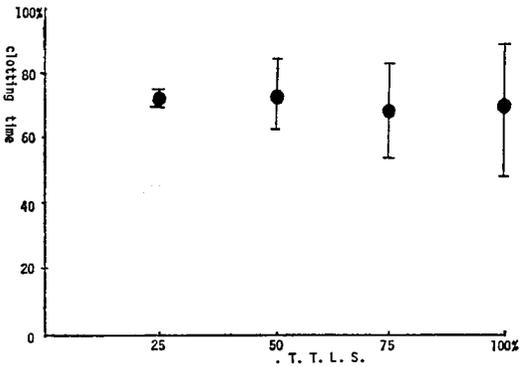


図15 T.T.L.S. by Quick method/Medulla; 2mins after bradykinin inj.

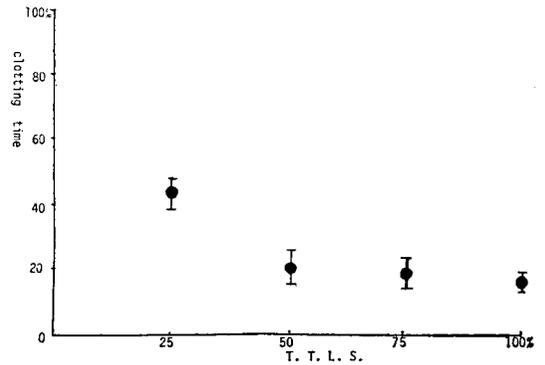


図18 T.T.L.S. by Astrup method/Normal cortex

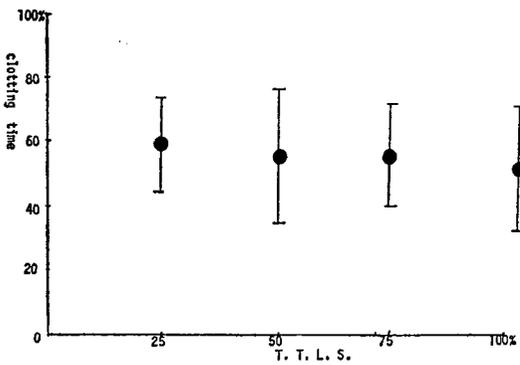


図16 T.T.L.S. by Quick method/Cortex; 10mins after bradykinin inj.

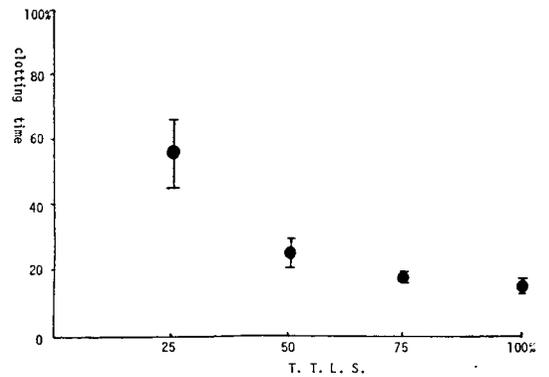


図19 T.T.L.S. by Astrup method/Normal medulla

腎皮質では、ブラディキニンの投与によりT.T.L.S.は増量し、とくに2分時のものの方が10分時のものよりその増強の程度は強かつた。腎髄質では、正常組織のものに比して減少傾向がみられ、

2分時と10分時のものととくに差はみられなかつた。

(B) Astrup 法

図18, 19の如く、成熟ウサギの正常腎組織には、皮膚、髄質ともにほぼ等量の凝固促進物質が

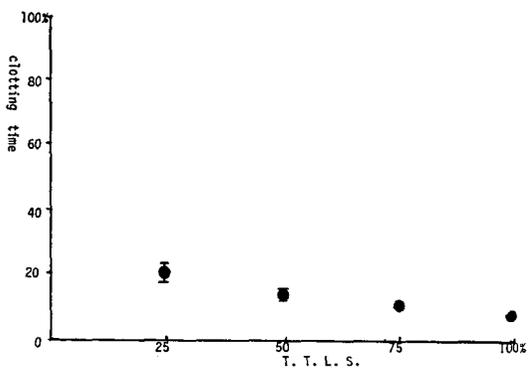


図20 T.T.L.S. by Astrup method/Cortex; 2mins after kallikrein inj.

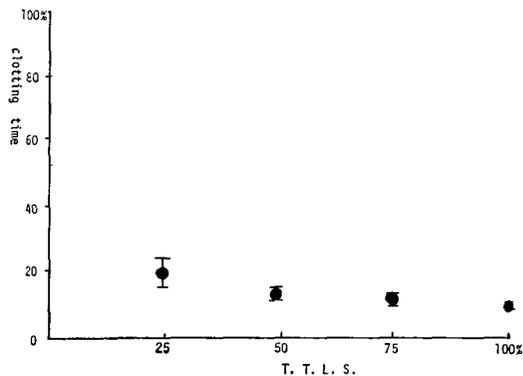


図23 T.T.L.S. by Astrup method/Medulla; 10mins after kallikrein inj.

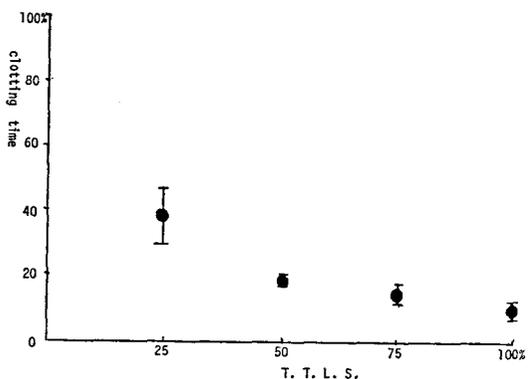


図21 T.T.L.S. by Astrup method/Medulla; 2mins after kallikrein inj.

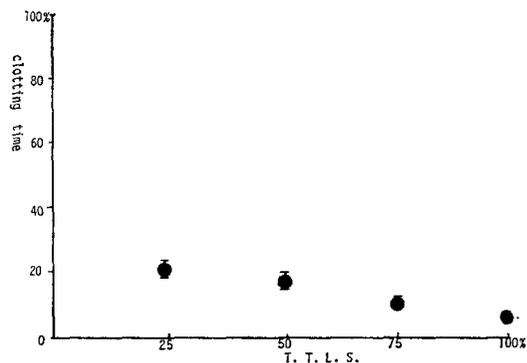


図24 T.T.L.S. by Astrup method/Cortex; 2mins after bradykinin inj.

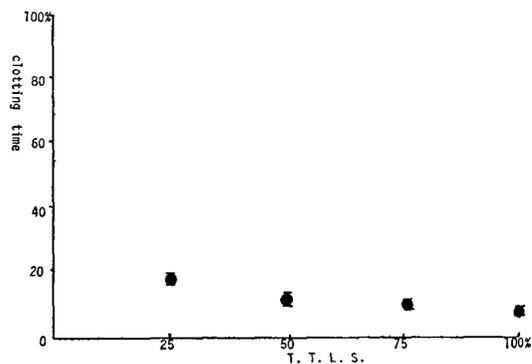


図22 T.T.L.S. by Astrup method/Cortex; 10mins after kallikrein inj.

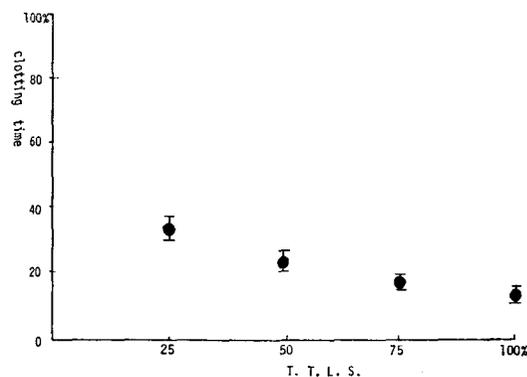


図25 T.T.L.S. by Astrup method/Medulla; 2mins after bradykinin inj.

に及ぼす影響は、図20、21、22、23の如くであつた。腎皮質、髄質ともにカリクレイン投与によりその T.T.L.S. は増量する傾向がみられた。

2) ブラディキニン 250 γ 投与群

含まれる。

- 1) カリクレイン40生物学的単位投与群
カリクレインの Astrup 法による腎の T.T.L.S.

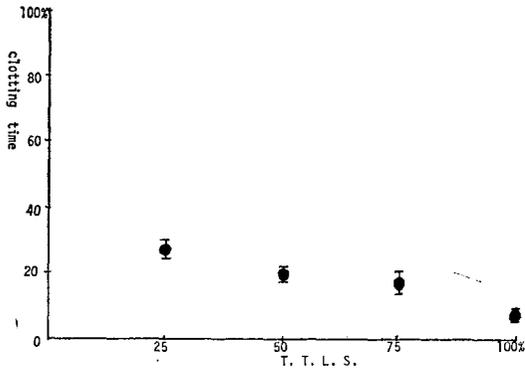


図26 T.T.L.S. by Astrup method/Cortex; 10mins after bradykinin inj.

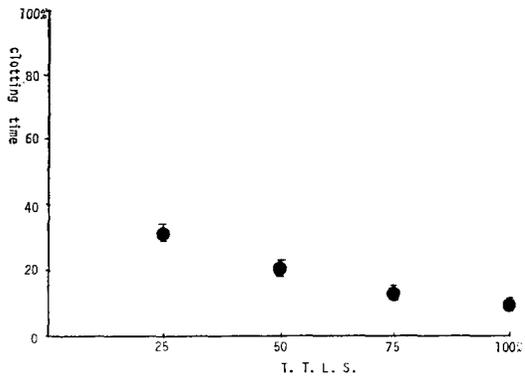


図27 T.T.L.S. by Astrup method/Medulla; 10mins after bradykinin inj.

ブラディキニンの Astrup法による腎のT.T.L.S. に及ぼす影響は、図24, 25, 26, 27の如くで、ブラディキニンは、腎皮質、髄質ともにそのT.T.L.S. を増量させる傾向を示し、とくに皮質の方がこの傾向は強かった。

小括：

Quick 法、すなわち、ウサギ腎組織のアセトン処理物質には正常ヒト血漿の凝固を促進させる作用があり、その作用は腎皮質、髄質ともにほぼ等しく、一応 T.T.L.S. とみなしえた。

しかし、図8～17に示す如く、その測定値は一定の傾向は示すが、バラツキが多く、希釈系列曲線も比較的 plateau となる検体が多かった。これに対して Astrup 法は、Quick 法によるよりも凝固促進作用は強く、Astrup 法も指摘する如くほぼ一定の結果が得られた (図18～27)。

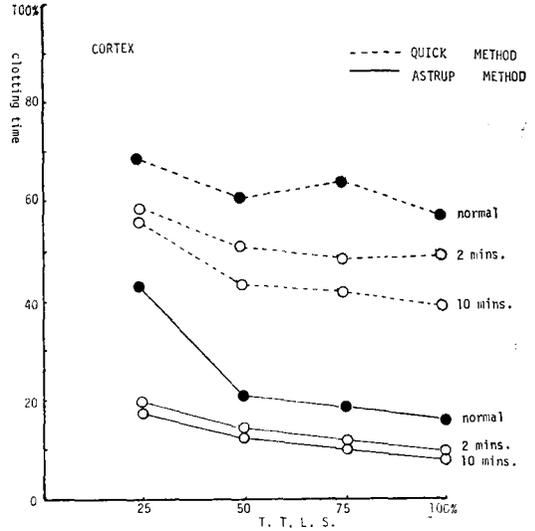


図28 Effects of kallikrein on renal T.T.L.S.

カリクレインの腎の T.T.L.S. に及ぼす影響：カリクレイン40生物学的単位を全身に投与した場合、腎皮質の T.T.L.S. は、図28の如く、Quick法では2分時、10分時とその活性は増強傾向を示したが、Astrup 法では2分時、10分時ともにほぼ同じ活性増強傾向を示した。

すなわち、大量のカリクレイン投与により、腎皮質の T.T.L.S. は Quick 法、Astrup 法いずれ

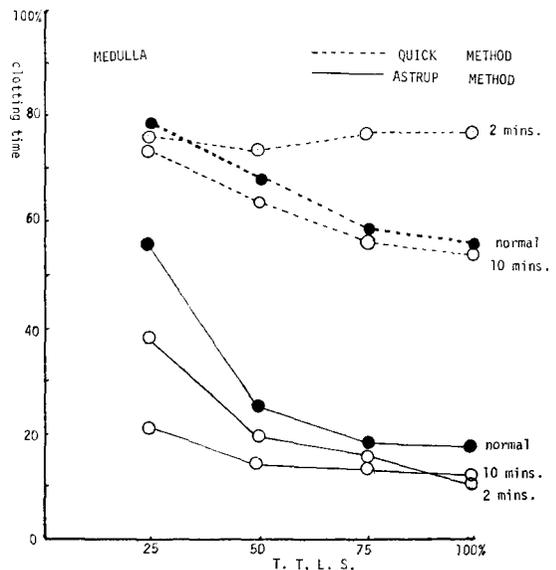


図29 Effects of kallikrein on renal T.T.L.S.

によつてもその活性は増強傾向を示した。

腎髄質では図29に示す如く、Astrup 法では2分時、10分時とその活性増強傾向を示したが、Quick 法では2分時はむしろその活性は低下し、10分時のものは正常値とほぼ等しかつた。

ブラディキニンの腎のT.T.L.S.に及ぼす影響：250γのブラディキニンを全身に投与した場合、腎皮質のT.T.L.S.は図30の如くで、Quick 法では2分時にその活性は著しく増強し、10分時には

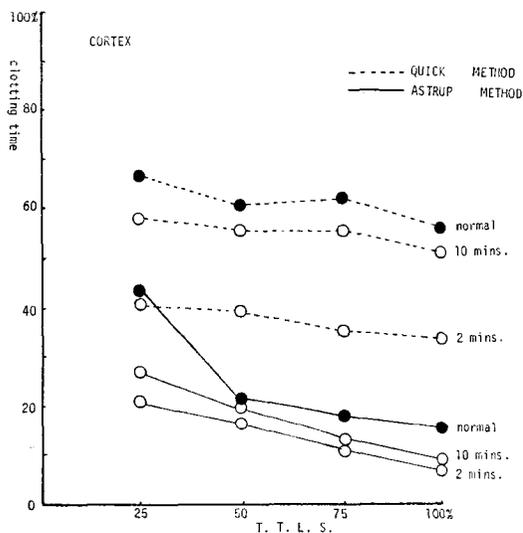


図30 Effects of bradykinin on renal T.T.L.S.

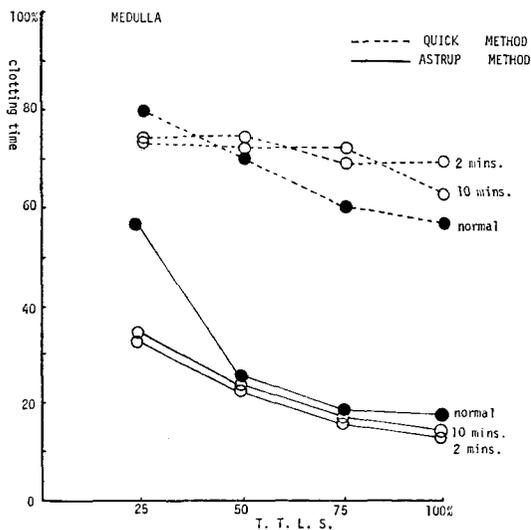


図31 Effects of bradykinin on renal T.T.L.S.

その増強度は減弱した。そして Astrup 法でも同じ傾向が示された。腎髄質 (図31) では Quick 法では2分時、10分時ともにその活性はほぼ同じ程度の減弱傾向を示すのに対して、Astrup 法ではむしろ活性増強の傾向をしめし、2分時のものの方が10分時よりもその増強度は強い傾向を示した。

以上、両薬剤ともに腎皮質の T.T.L.S. を増強させるが、しかし、その活性増強には時間的ズレがみられ、ブラディキニン投与時にはカリクレイン投与の場合と異なり、投与早期に腎皮質のT.T.L.S.の活性は最も強く増強される。しかし、腎髄質では Astrup 法では両薬剤ともに活性増強傾向が示されたのに対して、Quick 法ではカリクレイン投与では2分後、ブラディキニン投与では2分後、10分後ともにその活性は低下傾向を示した。

腎髄質の循環動態は複雑で、とくにショック時にはますます修飾される。その上、組織トロンボプラスチン測定法として確立されたものではなく、今回試みた Quick 法と Astrup 法についての相違は今後の基礎的研究にまたねばならない。

5. 腎組織の線溶系

腎組織の線溶能については、灌流腎組織片の標準フィブリン平板溶解によつて観察した。健常対照腎においては図32に示す如く、皮質には線溶作用のみられないものが多く、髄質にはすべてに線溶作用を認めた。カリクレイン投与群についてみ

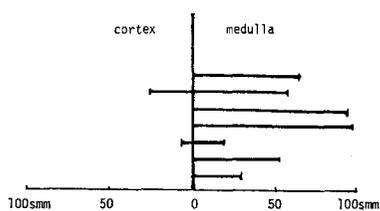


図32 Fibrinolytic activity of the renal tissue normal kidney

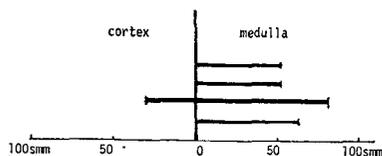


図33 Fibrinolytic activity of the renal tissue 2mins after kallikrein 40u. i.v. .inj.

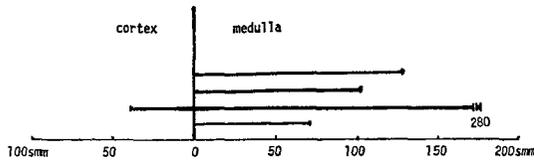


図34 Fibrinolytic activity of the renal tissue 10mins after kallikrein 40u. i.v. inj.

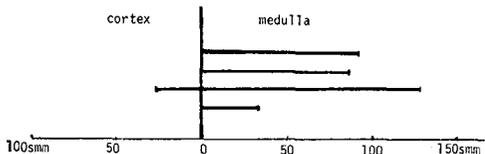


図35 Fibrinolytic activity of the renal tissue 2mins after bradykinin 250γ i.v. inj.

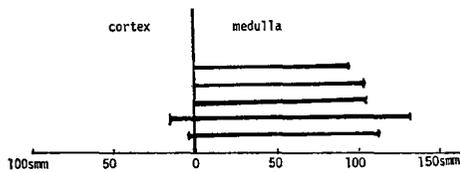


図36 Fibrinolytic activity of the renal tissue 10mins after bradykinin 250γ i.v. inj.

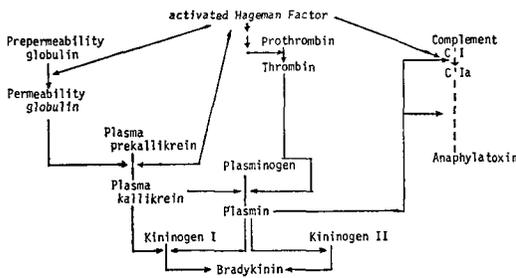


図37 Hageman 因子, Plasmin および Kallikrein の相互関係

ると、図33, 34にみられるように皮質では2分群10分群共に線溶を認めないものが殆どで、髓質にはすべてに線溶作用がみられ、かつ対照に比して強く、2分群より10分群に強い傾向がみられた。ブラディキニン投与群では図35, 36に示す如く、皮質は同様に2分群10分群共に線溶作用がみられないものが大部分であつた。髓質ではすべてに線溶作用がみられ、これらは対照群より強い傾向が示され、2分群より10分群に線溶作用が強くみられた。すなわち常に髓質が主役を演じている。こ

れは、組織アクチベーターは静脈壁に大量に含まれていると考えられていることと、髓質が血管に富む組織であることと一致している。

VI. 総括ならびに考按

生体内のブラディキニンで代表されるキニンの遊離機転については、図37の如く示される¹⁸⁾。そして、キニン遊離酵素のうち、カリクレインは生体内に広く分布しており、血漿、唾液、尿、糞などにあり、脾や上顎下腺、腸壁、十二指腸などに多く、またあらゆる腺組織に存在して、腺組織の生理機能と結ばれる酵素であるとされている¹⁸⁾。そして、カリクレインは通常、潜在型として存在し阻止物質の作用を受けており⁸⁵⁾、血漿カリクレインの活性型は成人と胎児とで異なるともいわれる⁸⁶⁾。そして、腎組織のカリクレインは顆粒状の結合型として存在するとされている⁸⁸⁾。ところで、活性遊離されたキニンは血漿のカルボキシペプチダーゼにより急速に水解され、これは強力大量のブラディキニン遊離による有害な作用を予防している⁸⁵⁾。また、血漿で不活性化されなかつたブラディキニンは腎に集積し、ここで不活性化されるといわれている⁸⁵⁾。ちなみに、腎に含まれるキナーゼには数種あり、その一つはプロリダーゼで、他の一つはカルボキシペプチダーゼである。そして、腎皮質からのものはブラディキニンの内部の Pro⁷-Phe 結合を切ると言われ¹⁴⁾、これはミクロゾームに含まれる⁸⁵⁾。

ところで、ショックとは有効循環血液量が不足して、重要臓器の末梢循環不全→酸素欠乏を基調とする代謝異常による生きる働きが極度に低下した状態である。ショック時にはカテコールアミンによる血圧の維持、細胞外液、とくにプラスマキニンによる機能的細胞外液の血管内移行などにより、脳や心筋などの血流はある程度維持されるが、末梢性の循環不全をきたすことになる。すなわち、細動脈の収縮、毛細血管や細静脈の拡張、微小循環系における凝血形成、さらに組織の壊死となつて不可逆性ショックへと移行することになる。かかる病態生理は全身の臓器組織で起こるわけであるが、この時、末梢血流停滞の代表的臓器として肝と腎が指摘され、腎の機能失調は乏尿や

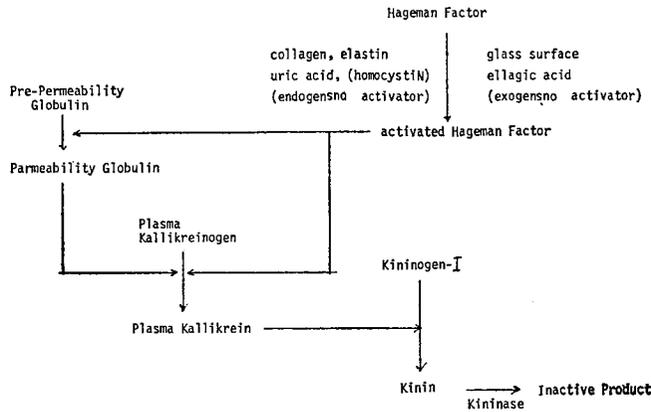


図38 血漿カリクレインによるキニン遊離

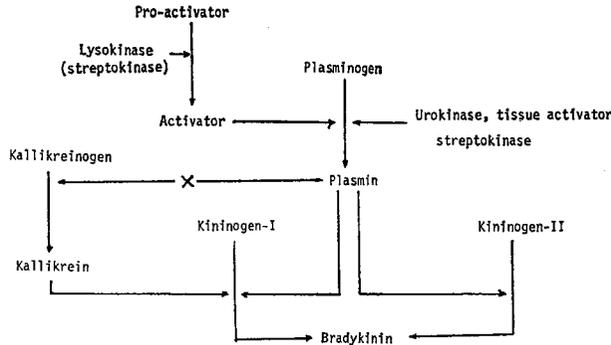


図39 プラスミンによるキニン遊離

無尿，すなわち腎不全となつてみられる⁷⁾。

アレルギー反応，アナフィラキシーショックの **chemical mediator** としてヒスタミン，アセチルコリン，セロトニン (5-HT) などが指摘されてきた¹⁵⁾。ところが，ブラディキニンの薬理作用には，1) 平滑筋収縮または弛緩，2) 血管拡張または血圧下降，3) 細静脈の透過性亢進，4) 疼痛発生，5) 白血球血管外遊走，6) 副腎髄質からのカテコールアミン遊離，7) 神経節刺激があげられている¹⁶⁾。そこで，当然，ショックにおけるキニン系の役割も注目され，とくに，エンドトキシンショックとアナフィラキシーショックにキニン系が関与することも明らかになった¹⁷⁾¹⁸⁾。この間，ペプタイドとしてのブラディキニンの構造も明らかにされ，その人工的合成も可能となるに及んだ。

キニン遊離機構のうち，ハーゲマン因子，プラ

スミン，およびカリクレインの相互関係は図38，39，40，41の如く示される¹⁸⁾¹⁶⁾。

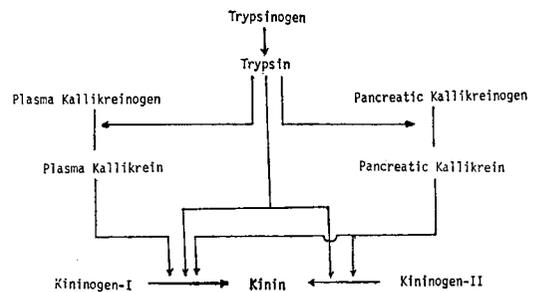


図40 トリプシンによるキニン遊離

今回，著者は一種のショック毒として，体重約3 kgの成熟ウサギに40生物学的単位のカリクレインと，250γのブラディキニン，それぞれを全身的に投与した場合の腎血流，腎の静脈血と組織の

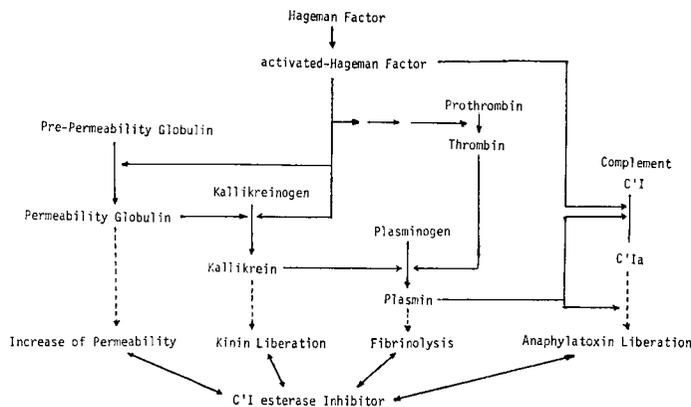


図41 ハーゲマン因子で活性化される酵素系 C'I エステラーゼインヒビターとの関係

凝固ならびに線溶系について検討した. この結果の詳細については先述したが, これを簡単にまとめると表1の如くなる.

宮永¹⁹⁾はモルモットに比較的大量のブラディキニンを投与した場合, アナフィラキシーショック類似のショック症状を呈し, その致死量は約 1.5 mg/kgであつたという. また河野¹⁸⁾はウサギに 85 γ /kgのブラディキニンを投与して, 今回と同様の症状をみている. ところが, 今回の実験においては大量のカリクレイン投与によつても, ブラディキニン投与時と同様, アナフィラキシーショック類似の症状を呈することを認めた. ところで, カリクレインは血管拡張剤として利用されてきたことは周知である. ブラディキニンの血管作用には, 直接作用と間接作用が指摘されている²⁰⁾. す

なわち, ブラディキニンの血管平滑筋に対する直接作用として血管の拡張をみるとされ, 少量では筋性微小血管を拡張し, 大量ではむしろ小動脈や小静脈を弛緩させる²²⁾.

この血管拡張は腎動脈であれ, 冠動脈, 上腸間膜動脈, 頸動脈, 大腿動脈のいずれにもみられるとされている. かくて, ブラディキニンは末梢血管を拡張し, 大動脈圧や全身の脈管の抵抗を低下させる²³⁾. Hauge らはブラディキニンの脈管系に対する作用部位は precapillary site であろうという²¹⁾. Mason⁸⁹⁾ らはブラディキニンの人体実験で, 血管の拡張に先だつて短時間ではあるが血管の収縮をみており, 代償性反射性のものと考えている. Guth²⁴⁾ らは微小循環系の観察によるウサギの耳の辺縁静脈がブラディキニン注射10秒後

表 1

	対 照 群	カリクレイン投与群	ブラディキニン投与群
一 般 的 観 察		アナフィラキシーショック類似のショック症状を呈するが数分後に回復	アナフィラキシーショック類似のショック症状を呈するが数分後に回復
腎 血 流 量		早期に減少後 次第に対照値に近づく	早期に減少後 次第に対照値に近づく
凝 固 時 間 (腎静脈血)		早期に充進 次第に対照値に近づく	早期に充進 次第に対照値に近づく
線 溶 能 (腎静脈血)		早期に充進 次第に対照値に近づく	早期に充進 次第に対照値に近づく
T.T.L.S. (Astrup法)	皮質>髓質	皮質>髓質共に増量を示す	皮質>髓質共に増量を示す
腎組織アクチベータ	皮質—存在せず 髓質—存在	皮質—存在せず 髓質—対照に比して増量	皮質—存在せず 髓質—対照に比して増量

に収縮をはじめ、25～35秒後にもつとも強く収縮して直径は約 $\frac{1}{2}$ にまでなるといふ。Majno²⁵⁾らはブラディキニンの投与初期には、細動脈の拡張がみられ、細静脈の収縮はまずないとし、細静脈の痙攣はブラディキニンによる leakage よりも、むしろ収縮によつて惹起された細胞内皮に対する直接作用であるといふ。ブラディキニンの循環系への作用は、原則的には末梢血管の拡張であり、自律神経系を介するものではない²⁸⁾。

しかし、これはあくまでも原則であつて、ブラディキニンがいわゆる nicotinic action を誘起して交感神経アミンの遊離を起こすブラディキニンの血液循環に対する間接的作用は、はやくから知られていた²⁰⁾。Guth²⁴⁾らは、その微小循環系の観察で、ブラディキニンによる静脈の収縮は静脈そのものに作用する部分と、交感神経アミンの遊離による部分との両者の加算であるとし、細静脈の拡張や血管透過性の亢進は静脈の収縮に付随した現象であるといふ。

これらにより、ブラディキニンを静脈内に投与すると、間接的な影響をうけて、当然反応は複雑になる。通常、動物にブラディキニンを静脈内に投与すれば動脈圧の低下が起こる。ところが、いわゆる paradoxical reaction として、すでに血圧が低い動物の場合にはブラディキニンの投与で動脈圧の上昇を起こすといふ²⁶⁾。尿中にはカリクレインが含まれ²⁷⁾また、キニンやキナーゼの存在することは周知で、これらの各種病態との関連についての報告も多い²⁸⁾。

Adetubiらはカリクレインは、腎糸球体の afferent arteriole の遠位の圧の変化に反応して遊離される腎内ホルモンで、これがネフロン毎のナトリウムの排泄を調節するのではないかと考えている²⁹⁾。腎動脈に微量のブラディキニンを注入した場合、腎血流量を増加させることは³⁰⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾、PAH-extraction や A-V oxygen saturation difference によつたり³¹⁾、selective renal pharmaco-angiography によつて示めされている³²⁾。

ブラディキニンは脳下垂体後葉に働いて anti-diuretic hormone (ADH) の遊離を起こす。

Yoshinaga らはイヌの腎動脈にブラディキニン

を注入した場合、GFR、RBFの増加と、尿管や尿中のNaやKの排泄増加をみており³³⁾、Mertzはヒトの脱水、乏尿の場合、ブラディキニンが分時尿量を増加させ、滲透圧クリアランス、イヌリンクリアランス、PAHクリアランスを軽度上昇させ、また同時に、尿/血漿滲透圧の低下をみてブラディキニンは腎血管に作用して、尿の希釈、濃縮に関与するといふ³⁴⁾。

カリクレインやブラディキニンを大量静脈内に投与しても、血中にキニンが存在している時間はそう長くはないとされている。そして血圧下降が著明で、血管の直接拡張作用が相殺されて各末梢臓器の拡張が思うようにあらわれないこともありうる。

Astrup & Permin⁴⁶⁾が腎には大量のプラスミノーゲンの組織アクチベーターが存在すると報告して以来多くの研究がある⁴⁷⁾。安藤⁴⁸⁾は腎の組織プラスミノーゲンアクチベーターの局在は血管に関連するもののみで、しかも静脈系ななくその内皮細胞にみられるといふ。McConnel ら⁴⁹⁾らは大量のプラスミノーゲン・アクチベーターが直静脈壁と乳頭の先端に存在し、前者は血中に遊離され、後者は尿中のウロキナーゼになると推定した。Back⁵⁰⁾はブラディキニンは、あるステップを経て二次的の反応としてプラスミン系の活性を起こすと考えた。

河野は85 γ /kgのブラディキニンを経静脈的に全身に投与した場合、3～4分間にわたる一時的排尿の停止をみている⁸⁾が、これは今回みられた腎静脈血環流の低下によるものと考えられる。彼はその後の血尿の出現と、血液、尿並びに腎組織の線溶能について検討した。そして、静注後早期に血中のウロキナーゼ阻止系が比較的増量し、20～30分後より血液線溶系が活性化して、この活性化の程度と血尿がパラレルにみられたといふ。また、血尿と尿の線溶能の増強が関連すること、大量のブラディキニンが腎皮質のプロアクチベーターを早期に大量に活性化すること、腎髄質ではアクチベーターが減少し、その後はプロアクチベーターを徐々に活性化し、髄質の線溶能は比較的一定に保たれることを報告し、この場合の血尿の発現

は腎髄質によつて起こっているものと推定した。

血液線溶系の測定法には、種々考案されている。ヒトの腎動脈血より腎静脈血の方が線溶活性が高いことは Buluk⁴³⁾や米瀬⁴⁴⁾らの報告がある。また Worowski⁴⁵⁾らは正常イヌの腎静脈血が末梢静脈血に比して、線溶活性は高く、プラスミノゲンとフィブリノーゲンは低値を示し、腎静脈血中にフィブリノーゲン分解産物(antithrombin VI)をみて、これが血液凝固の natural inhibitor であるとし、腎が生体内の凝固・線溶のバランスの維持に重要な役割を果たすと推測した。また、ショックにおけるプラスミンの役割は、これが一次的であれ、二次的であれ活性化されることは広く知られている。

今回、著者が試みた血液の凝固・線溶系の測定法によると、腎静脈血還流量減少程度とほぼ平行に、腎静脈血の凝固時間は短縮し、線溶亢進をみた。

組織トロンボプラスチンについての抽出法に確立されたものはない。坐骨神経刺激による腎組織の Quick 法による T.T.L.S.については、Kono⁴²⁾の報告がある。著者は、Quick が示した脳の組織トロンボプラスチン抽出法に準じた方法と、凍結→融解により組織トロンボプラスチンを細胞より遊離させようとする Astrup 法によつて検討した。両者における抽出並びに測定法については更に基礎的研究が必要となるが、その成績については先述の如くで、Astrup 法による方が比較的一定傾向をもち、再現性のある結果が得られた。したがつて、Astrup 法による T.T.L.S. についてみると、カリクレイン、ブラディキニンともに腎皮質の T.T.L.S. の活性を増強したが、カリクレインでは2分後、10分後ともにほぼ同じ程度の増強であつたのに対して、ブラディキニンの場合10分後のものより2分後のものの活性の方が強かつた。

腎髄質も、両薬剤によつてその活性は増強され、しかも両者共に10分後のものの方が2分後のものよりやや活性増強の傾向が示された。

また、組織の線溶能については組織片の標準フィブリン平板の溶解でみたにすぎないが、腎皮質の線溶能は両薬剤によつて殆ど影響を受けない。

しかし、腎髄質では両薬剤によつて組織線溶能は増強し、10分後のものの方が2分後のものよりやや活性が強い傾向がみられた。すなわち、大量のカリクレイン、ブラディキニンともに、腎静脈血の凝固・線溶系ともに活性化し、また、腎組織の T.T.L.S. 線溶系ともに活性化の傾向を示した。しかし、この際カリクレインのプラスミノゲンの活性化は、少量のカリクレインによる触媒的な作用ではない。また、ブラディキニンにしても、静脈内投与による場合は極めて複雑な反応となる事は先述の如くである。そこで、これらを一つ一つ解釈してゆかねばならぬが、カリクレインやブラディキニンは、生体内で容易に早急に不活性化されたり、破壊されたりするが、先述したように超大量の両薬剤を経静脈的、全身に投与すれば当然、腎組織に及びうるわけで、今回の実験成績を総合的に考慮すれば、腎静脈血還流量の変化、そして、これの凝固・線溶系の動きから両薬剤の血管作用に帰されるのではないかと考えられる。

大量のカリクレイン、ブラディキニンともに、腎皮質には虚血性変化をもたらすが、腎髄質の循環動態は正常でも複雑であり、passive な変化を示すことから、今回のような実験においても経時的に変動し、ますます複雑となつて展開することが予測される。そして、ショック時の腎不全は腎皮質の虚血性変化にその殆どが帰納され、この際、ショック腎の病態生理における腎皮質の血管内凝固、部分的な線溶の関与は、ともすれば、腎皮質の T.T.L.S. 活性増強と、とくに関連が深いことが指摘されないことはない。しかしカリクレインによるキニンの遊離、ブラディキニンの組織損傷の mediator としての影響⁸⁵⁾、炎症性 mediator が血漿カリクレインを直接活性化するのではなく、むしろ血管の透過性を変化し、これによつて血漿カリクレインが脈管外間隙に出て、ここで活性化される⁸⁷⁾ことの指摘などもあり、虚血性変化にすべてを帰納することはもちろん許されない。

まとめ

ショック毒として40生物学的単位のカリクレインと、250γのブラディキニンを、体重約3kgの成熟ウサギに、経静脈的に全身に投与した場合の

腎を中心とした凝固・線溶系に及ぼす影響について検討した。

1) 両薬剤静注終了後2—3分間アナフィラキシー様症状を惹起する。

2) 両薬剤投与直後に、腎静脈の還流量は著減し、その後は徐々に回復する。カリクレインでは7分後には投与前値にもどり、その後それ以上になるが、ブラディキニンの場合、術前値に回復しなかつた。

3) 腎静脈血は耳静脈血に比して、凝固・線溶能ともに高い。両薬剤注入直後に腎静脈血の凝固・線溶能ともに著しく亢進し、10分後にはほぼ術前復帰した。

4) T.T.L.S.はAstrup法の方がQuick法よりも一定の傾向、再現性が大きかつた。腎のT.T.L.S.はQuick法、Astrup法共に再薬剤によりその活性は増強した。しかし、腎髄質はバラツキが大きかつた。

5) 組織片による線溶能は、腎皮質はほとんど線溶能を示さず、両薬剤によつても活性化されなかつた。腎髄質は線溶能をしめすが、両薬剤ともにこの活性を増強し、投与2分後よりも10分後の方が活性増強の傾向は強かつた。

稿を終るに臨み、本研究の機会を与えられご指導ご校閲いただいた恩師梅津隆子教授、終始直接ご指導下さつた河野南雄講師に深謝致します。

なお、実験に種々ご協力下さつた益子五月助手はじめ泌尿器科学教室の諸先生方に心より感謝の意を表します。

(本論文の要旨は、昭和48年10月東京女子医科大学学会第185回例会(昭和48.10.26)において発表した。)

参考文献

- 1) **Margolis, J.:** J Physiol (London) **144** 1 (1958)
- 2) **Margolis, J.:** ibid **151** 238 (1968)
- 3) **Margolis, J., E.A. Bishop:** Nature **194** 749 (1962)
- 4) **Eisen, V. and C.A. Keele:** J Physiol (London) **154** 20 (1960)
- 5) **Back, N. and R. Stegar:** Life Sci **4** 153 (1965)
- 6) **Rocha, E.S., W.T. Beraldo and G. Rosenfeld:** Amer J Physiol **156** 261 (1949)
- 7) 河野南雄: 入局(室) 1~2週間の外科系研修入門 医学図書出版 東京(1972) 19頁
- 8) 河野南雄: 日泌尿会誌 **57** 1156 (1966)
- 9) 河野南雄: 東女医大誌 **40** 528 (1970)
- 10) **Quick, A.J.:** Amer J Physiol **114** 282 (1936)
- 11) **Quick, A.J.:** Science **92** 113 (1940)
- 12) **Astrup, T., O.K. Albrechtsen M. Classen, and J. Rasmussen:** Circulation Research **7** 969 (1959)
- 13) 鈴木友二: 日本医師会誌 **63** 913 (1970)
- 14) 鈴木友二・鹿取 信: キニンとその周辺. 中外医学社 東京(1972) 88頁
- 15) 河野南雄: 免疫・アレルギー・炎症—現代人の病気の見方・考え方 金原出版 東京(1970) 125頁
- 16) 鹿取 信: 日本医師会誌 **63** 947 (1970)
- 17) **Bradley, J.:** Lancet **2** 548 (1971)
- 18) 藤井節郎・堤 健: 日本医師会誌 **63** 924 (1970)
- 19) 宮永嘉隆: アレルギー **13** 605 (1964)
- 20) 橋本虎六: 代謝 **5** 266 (1968)
- 21) **Hauge, A., P.K. Lunde and B.A. Waaler:** J Physiol (London) **173** 33 (1964)
- 22) **Altura, B.M.:** Amer J Physiol **212** 1447 (1967)
- 23) **Harrison, D.C., W.L. Henry, B. Paaso and H.A. Miller:** Amer J Physiol **214** 1035 (1968)
- 24) **Guth, P.S., R. Bobbin, G. Gano and J. Amaro:** Fed Proc **25** 549 (1966)
- 25) **Majno, G., V. Gilmore and M. Leventhal:** Circulation Res **21** 833 (1967)
- 26) **Parratt, J.R.:** J Pharm & Pharmacol **16** 132 (1964)
- 27) 宮下 厚: 日泌尿会誌 **62** 507 (1971)
- 28) 阿部圭志: 日本医師会誌 **63** 954 (1970)
- 29) **Adetuiibi, A. and I.H. Mills:** Lancet **2** 203 (1972)
- 30) **Nakano, J.:** Arch Intern Pharmacodyn **157** 1 (1965)
- 31) **Breckenridge, A., C.T. Dollery, L.I. Goldberg, B. and L. Pentecost:** J Physiol (London) **184** 60 (1966)
- 32) **Helelä, T. and P. Virtama:** Invest Radiology **3** 149 (1970)
- 33) **Yoshinaga, K., K. Abe., I. Miwa., T. Furuyama and T. Suzuki:** Experimentaria **20** 396 (1964)
- 34) **Mertz, D.P.:** Arzneimittel-Forsch **17** 440 (1967)
- 35) **Erdös, E.G.:** Gastroenterology **51** 893 (1966)

- 36) **Melmon, K.L., A.M. Rudolph, T. Hughes, A.S. Nies and M.J. Cline:** J Clin Invest **46** 1094 (1967)
- 37) **Zachariae, H., W. Pettinger and J.A. Oates:** Clin Res **14** 277 (1966)
- 38) 鈴木友二・鹿取 信: キニンとその周辺, 中外医学社 東京 (1972) 6頁
- 39) **Mason, D.T. and K.L. Melmon:** Circ Res **17** 106 (1965)
- 40) **Barraclough, M.A. and I.H. Mills:** Clin Sci **28** 69 (1965)
- 41) **Dollery, C.T., L.I. Goldberg and B.L. Pentecost:** Clin Sci **29** 433 (1965)
- 42) **Kōno, N.:** Bulletin of the Heart Institute Japan pp 20 (1969)
- 43) **Buluk, K. and M. Furman:** Experimentaria **18** 146 (1962)
- 44) 米瀬泰行: 日泌尿会誌 **62** 819 (1971)
- 45) **Worowski, K., S. Niewiarowski and J. Prokopowicz:** Thromb Diath Haemat **12** 87 (1964)
- 46) **Astrup, T. and P.M. Permin:** Nature **161** 689 (1948)
- 47) 河野南雄: 日泌尿会誌 **58** 1202 (1967)
- 48) 安藤征一郎: 日泌尿会誌 **62** 819 (1971)
- 49) **McConnel, D., J.G. Johnson., R. Holemans and L.A. Cohen:** Fed Proc **25** Part I, **33** 1429 (1966)
- 50) **Back, N.:** Fed Proc **25** 77 (1966)
-