

原著

## 糸球体硬化症モデルラットにおける腎障害発症機序に関する検討

今井 比呂恵

**Mechanism of Progression of Renal Insufficiency in Rat with Glomerulosclerosis**

Hiroe Imai (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

**Objective:** To investigate the role of the renin-angiotensin system and sodium in the pathogenesis of glomerulosclerosis, I examined the effect of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) and angiotensin II receptor blocker (ARB) on blood pressure and renal function in rat with glomerulosclerosis, Milan normotensive rats (MNS). **Method:** Experiment 1: Twenty-four 8-week old MNS were divided into three groups as follows (1) Normal-salt diet group (0.5%NaCl), (2) Low-salt diet group (0.1%NaCl), and (3) High-salt diet group (6.0%NaCl). Each diet was given for 32 weeks. Experiment 2: Twenty-four 8-week old MNS were divided into three groups as follows (1) ACEI treated group (Delapril 10mg/kg/day), (2) ARB treated group (CV-116 3mg/kg/day), and (3) placebo treated group (control). Each of these antihypertensive drug was administrated per os for 32 weeks. In both studies, during the experiment, body weight, blood pressure and urinary excretion of protein were measured every four weeks. At the end of study, after measurement of plasma angiotensin I, angiotensin II, aldosterone and renin activity, renal tissues were obtained for light microscopic examination and for measurements of AT1a receptor, AT2 receptor, ecNOS and HO-1 mRNA by using RT-PCR. **Results:** Experiment 1: During the experiment, renin-angiotensin system was high level in normal salt-diet group and it was more activated in low salt-diet. There were no significant differences in blood pressure in three groups. Marked glomerulosclerosis and interstitial cell infiltration, which were found in MNS were significantly aggravated by low-salt diet. On the contrary, glomerular changes were significantly ameliorated by high-salt diet. Experiment 2: Systolic blood pressure and urinary excretion of protein in MNS was significantly reduced by administration of ACEI. ACEI treatment induced significant elevation of the expression of AT2 receptor, ecNOS and HO-1 mRNA in the kidney. ARB treatment induced significant reduction of the expression of ecNOS and HO-1 mRNA in the kidney. Marked glomerulosclerosis and interstitial cell infiltration, which were found in the control group were significantly ameliorated by treatment of ACEI. On the contrary, there was no significant improvement in ARB treated group. **Conclusion:** From these data, I concluded that histopathological change in the kidney in MNS was determined by the activation of renin-angiotensin system. On the contrary, nitric oxide and heme-oxygenase plays as the protective role in the renal insufficiency. Furthermore, ACEI and ARB were different from renalprotective effect in rat with glomerulosclerosis.

**Keywords:** Glomerulosclerosis, Renin-Angiotensin System, Nitric Oxide, Heme Oxygenase

*J Saitama Med School 2002;29:35-50*

(Received December 7, 2001)

## 緒言

平均寿命の延長に伴い高齢者は増加しており、加齢による高血圧、動脈硬化、脳血管障害の増加、それに関連する腎障害も増加傾向にある<sup>1,2)</sup>。現在では、これらの腎障害は一括して腎硬化症と呼ばれており、病理

所見として細動脈硬化ならびに糸球体硬化を特徴とし、治療および予防が極めて重要となっている<sup>3)</sup>。腎硬化症は今後高齢者の増加に伴い、確実に増加するであろう原因疾患と言われている<sup>4,7)</sup>。腎硬化症の発症機序には、長年の高血圧症が強く関与していることが知られているが<sup>8,9)</sup>、それ以外の要素も関与していることが知られている<sup>10)</sup>。高血圧以外の要因として、遺伝的素因や腎血行動態、代謝性因子や種々の血管作動物質

の影響などが考えられる<sup>10)</sup>が、その関与については依然として不明な点も多く、降圧療法以外の有効な治療方法は確立していない<sup>11,12)</sup>。そのため、降圧療法が十分進歩しているにも関わらず透析導入となる腎硬化症患者数は確実に増加している<sup>4,13)</sup>。

今回検討に用いたMilan normotensive rat (MNS)は腎障害進展因子として知られている高血圧や免疫異常等を伴わないにもかかわらず、加齢に伴い糸球体硬化ならびに間質病変が進展し、末期腎不全に至る腎障害モデルラットであることが報告されている<sup>14)</sup>。Milan ratは1973年にイタリアのBianchiらがWistar ratから分離した1群であり、Milan hypertensive rat (MHS)とMNSに分類される<sup>15)</sup>。特にMNSは、若年期より糸球体硬化や間質障害を来すが、血圧は末期腎不全を呈するようになるまで上昇することはなく、細小動脈の硬化は殆ど認めないという特徴的な病態を示しており、生後16週で尿蛋白の出現、20週で糸球体硬化および間質の線維化と細胞浸潤の病態を呈し40-48週で末期腎不全を来し死亡することが報告されている<sup>16)</sup>。即ちMNSは、正常血圧であるにも関わらず早期より糸球体硬化を来し、1年以内に殆どが末期腎不全に至り死亡するという特徴を呈する。MNSでの腎障害進展機序に関してBianchiらを中心に多くの検討がなされてきた<sup>14)</sup>。TXA2を中心としたアラキドン酸カスケード系の関与<sup>17)</sup>、さらに高脂血症や高血糖などの代謝系の異常の関与<sup>18)</sup>が報告されている。以上のように、MNSは高血圧症を伴わずに腎障害の進展を見ることから、高血圧以外の糸球体硬化の進展機序を明らかにするのに極めて有用なモデルと考えられた。

今回高血圧以外の糸球体硬化症の進展機序を明らかにし、さらにその治療方法を確立するためにMNSの腎障害進展機序についてRenin-Angiotensin系、さらに一酸化窒素(NO)ならびにHeme-oxygenase(HO)の面から検討を行った。

## 対象ならびに方法

### 対 象

体重160-250gのMNS総数48匹を用いた。尚、MNSについては、藤田保健衛生大学実験動物センター(高橋久英教授)より御提供いただいた。

実験1. Milan normotensive ratの食塩感受性に関する実験

8週齢のMNS雄(n=24)を、L群:減塩食群(0.1% NaCl食, オリエンタル酵母(株), 東京, n=8), C群:正塩食群(0.5% NaCl食, オリエンタル酵母(株), 東京, n=8), H群:高塩食群(6.0% NaCl食, オリエン

タル酵母(株), 東京, n=8)の3群に分類し、32週間にわたって経過観察した。4週毎に体重、血圧、尿量、尿蛋白排泄量、尿中のナトリウム(Na)、カリウム(K)およびクロライド(Cl)排泄量を測定した。実験終了後(40週齢時)に断頭採血し、血漿angiotensin I (Ang I) およびangiotensin II (Ang II), aldosterone (PAC), renin activity (PRA), および血清の総蛋白(TP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Crtnn), およびNa, K, Clの測定を行った。その後、開腹にて摘出した左腎臓を用いて病理組織標本を作製した。さらに右腎臓は液体窒素を用いて急速凍結し、-80℃で保存後RNAを抽出し、endothelial nitric oxide synthetase (ecNOS), heme-oxygenase-1 (HO-1), angiotensin II type 1a (AT1a) 受容体, angiotensin II type 2 (AT2) 受容体のmRNAの発現を、半定量的Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法を用いて確認した。

実験2. Milan normotensive ratの腎障害進展におよぼすRenin-Angiotensin (R-A)系に関する実験

8週齢のMNS雄(n=24)を、placebo群:0.5% NaCl食+1%エタノール溶液 1ml/day(n=8), ACEI群:0.5% NaCl食+Angiotensin converting enzyme阻害薬(ACEI):Delapril 10mg/kg/day(n=8), ARB群:0.5% NaCl食+Angiotensin II type1a受容体拮抗薬(ARB):CV116 3mg/kg/day(n=8)の3群に分類し32週間にわたって経過観察した。DelaprilならびにCV116は、1%エタノール溶液に溶解し胃管栄養法(gavage法)を用いて32週間連日経口投与し、投与期間中、実験1.と同様に4週毎で体重、血圧、尿量、尿蛋白排泄量、尿中Na, K, Cl排泄量を測定した。実験終了後(40週齢時)に断頭採血し、血漿Ang I, Ang II, PAC, PRA, および血清TP, BUN, Crtnn, Na, K, Clの測定を行った。さらに、実験1.と同様の方法で、左腎臓を用いて病理組織標本を作製し、右腎臓を用いてecNOS, HO-1, AT1a受容体, およびAT2受容体のmRNAの発現を半定量的RT-PCR法にて確認した。

### 各種測定項目ならびに測定方法

#### 血圧測定方法

収縮期血圧はtail cuff法(ソフトロン非観血式自動血圧測定装置, BP-98A株式会社ソフトロン, 東京)を用いて5回連続して測定し、その最高ならびに最低血圧を除いた3回の平均血圧を用いた。

#### 尿量測定および尿検査法

尿量、尿蛋白排泄量、尿中Na, KおよびCl排泄量は4週毎に測定し32週間経過観察した。採尿は、蓄尿ゲージを用いて24時間毎の採取を72時間施行し、その平均値を用いた。尿蛋白排泄量はピロガロールレッド

法<sup>19)</sup>を用いて、さらに尿中Na, KおよびCl排泄量は、イオン選択電極法<sup>20)</sup>を用いて測定した。尿蛋白排泄量および、尿中Na, K, Cl排泄量は原則として、3日間の測定を行いその平均値とした。尿中Crtnn測定は酵素法<sup>21)</sup>を、尿中BUN測定はウレアーゼ・UV法<sup>22)</sup>を用いた。

#### 血液生化学的測定方法

血漿Ang I, Ang II, PAC, PRAおよび血清TP, BUN, Crtnn, Na, K, Clを測定した。採血した血液は、氷冷したethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)・2Na入り採血管(5 ml)に注入し、それぞれの検体は直ちに遠心分離後、上清を採取し、-20℃で測定まで凍結保存した。Ang I, Ang IIおよびPACは第1抗体液として、抗Ang-I, 抗Ang-IIおよび抗Ald抗体ウサギ血清を、第2抗体液として、抗ウサギ抗体ヤギ血清を用い、そしてトレーサー溶液として<sup>125</sup>I-angiotensin I, <sup>125</sup>I-angiotensin II<sup>23,24)</sup>および<sup>125</sup>I-aldosterone (アルドステロン・リアキットII, ダイナボット株式会社, 東京)<sup>25)</sup>を用いたラジオイムノアッセイにより測定した。PRAはガンマー・コートTMレニンキット(デイドベリング株式会社, 東京)<sup>26)</sup>を用いて測定した。血清Crtnn測定は酵素法<sup>21)</sup>を、血清BUN測定はウレアーゼ・UV法<sup>22)</sup>を用いた。

#### RNAの抽出

摘出した右腎臓を液体窒素で凍結固定し、TRISOL (GIBCO BRL Rockville, MD, USA)を加え、ホモジナイザー、テフロンコッターを用いて均質化した。その後、Chloroform, phenol/chloroform/isoamylalcohol (PCL), propanol, ethanolおよび3Mの酢酸ナトリウムを用いてethanol沈殿を行い、実験前に75%エタノールで処理後、DEPC処理水を加え実験に用いた。

#### RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) 法による検出

逆転写酵素反応: Reverse transcription (RT) を用いて、あらかじめRNAを鋳型としたcDNAの合成反応を行い、それを鋳型として各種 primerを用いたポリメラーゼ反応polymerase chain reaction (PCR) をGeneAmp PCR sysem 9600 (Perkin-Elmer, Inc, MA, USA) を用いて行った。

DEPC処理水に溶かしたRNAのDnase I処理を行った。DNase I 10× Buffer, DNase I amplification Grade (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA)を加えて全量で10 μlを37℃で15分間加温し、次に、それにEDTA 1 μl加え、さらに70℃, 15分間加温し、DNase Iの反応を停止した。これにOligo (dT) primer (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) 3 μl, 5× first Buffer 6 μl, dithiothreitol (DTT) 3 μl, dNTP

mixture (TAKARA, 東京) 6 μl, 逆転写酵素であるSuper script II (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) 0.7 μlを加え、42℃, 60分で保温し、RT反応をさせた。このcDNA 1 μlにDEPC処理水 32.5 μl, Dimethyl Sulfoxide (DMSO, SIGMA-ALDRICH, MU, USA) 5 μl, 10× PCR Buffer (TAKARA, 東京) 5 μl, dNTP mixture 4 μl, Forward Primer (Fw) 1 μl, Reverse Primer (Rv) 1 μl, rTaq polymerase (TAKARA, 東京) 0.5 μlを加えて全量で50 μlとし、これを94℃で5分、さらに94℃で30秒, 58℃で1分, 72℃で2分を25cycleという条件でPCR反応させた。1%アガロースゲルを作成し、100 Vで30分間泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、そのゲルの写真をスキャナー (EPSON GT-9600, EPSON社, 東京) を用いてMacintosh上に取り込み、全てのデータは画像解析ソフトであるNIH Image (Scion Corp., Frederick, Maryland, USA) を用いて解析、定量化し、その測定値は内部コントロールであるGAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の値で除して相対値を算出した。

#### Primerの作成

Primerの作成に関してecNOS, AT1a受容体, AT2受容体, HO-1の各々のモチーフを保存している既知の塩基配列より、各々の部位が増幅するよう primerを設計した。各種Primerの構造については、以下に示す通りである。尚、括弧内には今回の primer設計に用いた塩基配列のGene Bank accession numberおよび、PCR fragment sizeを示す。

ecNOS primer (AF85195, 587bp)

Fw:5' -GCAGCATCACCTACGATACC-3'

Rv:5' -CTCAGTGATCTCCACGTTGG-3'

AT1a primer (M86912, 375bp)

Fw:5' -CATGAAGCTGAAGACTGTGGC-3'

Rv:5' -GCGCACACTGTGATATTGG-3'

AT2 primer (U22663, 1126bp)

Fw:5' -TTGCTGCCACCAGCAGAAAC-3'

Rv:5' -GTGTGGGCCTCCAAACCATTGCTA-3'

HO-1 primer (J02722, 450bp)

Fw:5' -TGGAAGAGGAGATAGAGCGA-3',

Rv:5' -TGTTGAGCAGGAAGGCGGTC-3'

GAPDH primer (M17701, 452bp)

Fw:5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',

Rv:5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

### 病理組織学的検討

臓器の重量を測定後、摘出した左腎を10%ホルマリンに固定した。それを用いて厚さ2~3  $\mu$ mの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色、さらにマロリー染色後、光学顕微鏡Olympus provis AX80T-64FLBD (Olympus Optical CO., Ltd., 東京)を用いて顕鏡、撮影した。

#### a. 糸球体変化の比較 (Sclerosis Index)

糸球体変化はPAS染色により、Raijiの報告した<sup>27)</sup> Sclerosis Index Scoreを基に判定した。基準としては糸球体の変化のないもの(-)、軽度のメサンジウムの肥厚を示すもの(±)、segmental sclerosis (+)、global sclerosis (++)とし、50個の糸球体を判定し、糸球体硬化度としてそれぞれを1-4点とし、その平均点を糸球体硬化指数(Sclerosis Index)とした。

#### b. 血管病変の比較 (Arteriolosclerosis Index)

血管病変については、Katsumataらの報告<sup>28)</sup>に基づきArteriolosclerosis Index Scoreを基に判定した。基準として変化のないもの(-)、血管壁の軽度の線維性肥厚が認められ、細動脈硬化症と診断されるもの(±)、内膜下よりさらに一部筋層まで血漿成分の浸潤が見られるが、血管壁の細胞増殖の著しくないもの(+)、内腔がほとんど閉塞し、筋層、外膜細胞の著しい増殖が見られるもの(++)とし、10個の血管を判定し、Arteriolosclerosis Scoreとしてそれぞれを1-4点とし、その平均点を動脈硬化指数(Arteriolosclerosis Index)とした。

#### c. 間質病変の比較 (Interstitial cell infiltration score)

間質病変についてはNakamotoらの報告<sup>29)</sup>に基づき、Interstitial cell infiltration scoreを計算した。強拡大一

視野中の間質の細胞浸潤数を計測し、その20視野の平均を間質細胞浸潤指数(Interstitial cell infiltration score)とした。

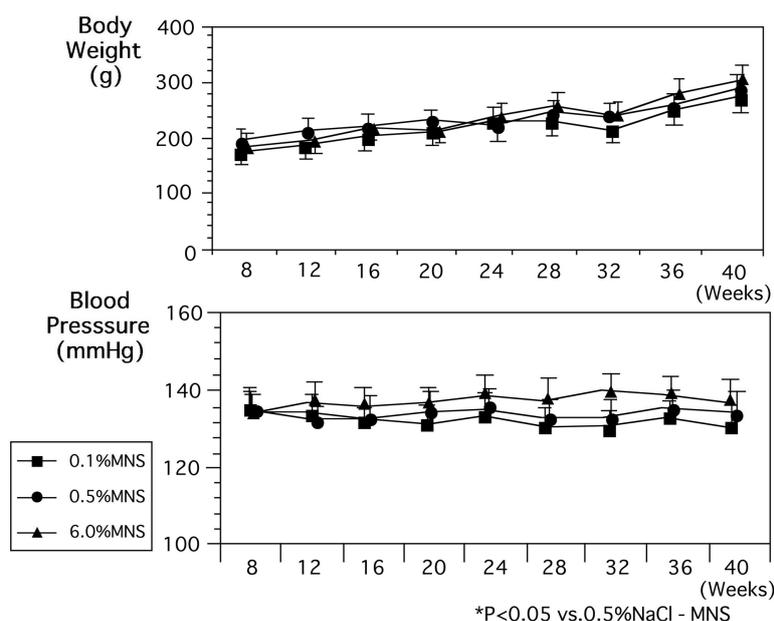
### 統計

データはすべて平均値±標準誤差で表し、統計解析はMacintoshのStatview IV (SAS Institute Inc NC USA)を使用した。血圧、体重、尿量、尿蛋白排泄量、尿中Na排泄量、尿中K排泄量ならびに尿中Na/Kについては、Two-way analysis of varianceを用いて群間比較を行った後、Scheffe's Fを行い、また血漿ホルモンの変化、Sclerosis Index, Interstitial cell infiltration score, Arteriolosclerosis Index, 血清Na, K, Cl, BUN, Crtnn濃度ならびにRT-PCRのデータについては、One-way analysis of varianceを用いた後、Scheffe's Fを行い、統計上 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

### 結果

#### 実験1. Milan normotensive ratの食塩感受性に関する検討 (1) 体重および血圧の経時的変化

体重の変化は、正塩食群は8週齢で $190.4 \pm 9.2$  gが40週齢で $280.5 \pm 19.5$  g、減塩食群は8週齢で $180.5 \pm 8.6$  gが40週齢では $261.8 \pm 20.3$  g、加塩食群は8週齢で $185.5 \pm 10.2$  gが $295.6 \pm 24.2$  gで、3群間で有意な差は認められなかった。血圧の経時的変化では、減塩、加塩による有意な血圧の変動は認められず、40週齢における血圧は減塩食群で $132.8 \pm 10.1$  mmHg、正塩食群で $135.6 \pm 11.5$  mmHg、加塩食群では $138.8 \pm 9.8$  mmHgであった。(Fig. 1)。



**Fig. 1.** Effects of low- or high-salt diet on systolic blood pressure (SBP) and body weight in MNS. Values are expressed as means $\pm$ SEM. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , statistically significant difference compared with normal-salt diet group at identical times.

(2) 尿量および尿蛋白排泄量の経時的变化

尿量の変化は、40週齢で、正塩食群は11.8±1.0 ml/day，減塩食群は6.1±0.6 ml/dayと低下を認め、加塩食群は73.8±7.2 ml/dayと有意な上昇を認めた。尿蛋白排泄量の変化は、40週齢で、正塩食群は476.3±40.7 mg/day，減塩食群は588.9±48.2 mg/dayと有意な尿蛋白排泄量の増加を認めた。一方、加塩食群は、尿蛋白の発現は遅延し、40週齢で398.2±38.8 mg/dayと有意な減少が見られた (Fig. 2)。

(3) 尿中Na，K排泄量およびNa/Kの経時的变化

尿中Na，K排泄量およびNa/Kは、全群において有

意な経時的变化は認められなかった。しかしながら、40週齢における尿中Na排泄量は、正塩食群は1.75±0.15 mEq/day，減塩食群は0.43±0.04 mEq/dayと低下しており、加塩食群は25.9±2.24mEq/dayと有意な上昇が認められ、一方、40週齢での尿中K排泄量は、正塩食群が4.8±0.38 mEq/day，減塩食群は4.3±0.32 mEq/day，加塩食群は5.0±0.35 mEq/dayと有意な差は認められなかった。尿中Na/Kは、40週齢で、正塩食群は0.36±0.03，減塩食群は0.10±0.01と低下を認め、加塩食群は5.18±0.37と有意な上昇を認めた (Fig. 3)。

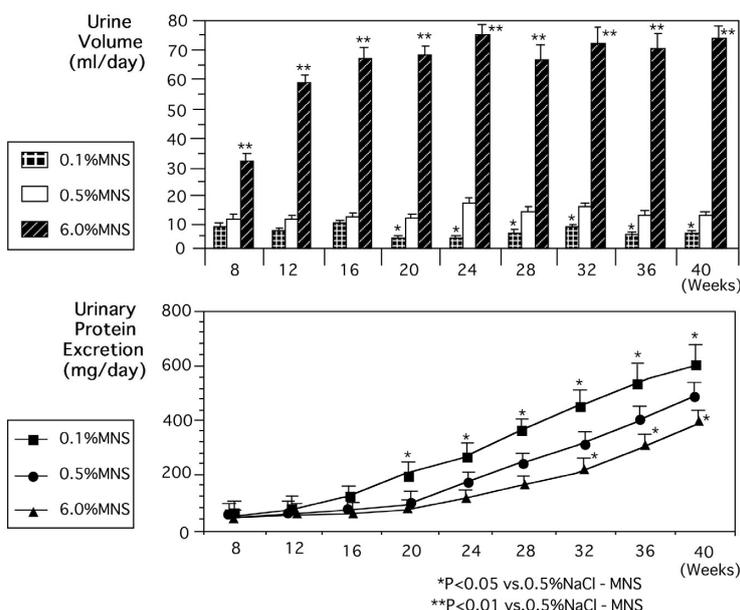


Fig. 2. Effects of low- or high-salt diet on urinary excretion of protein and urinary volume in MNS. Values are expressed as means±SEM. \*\*P<0.01, \*P<0.05, statistically significant difference compared with normal-salt diet group at identical times.

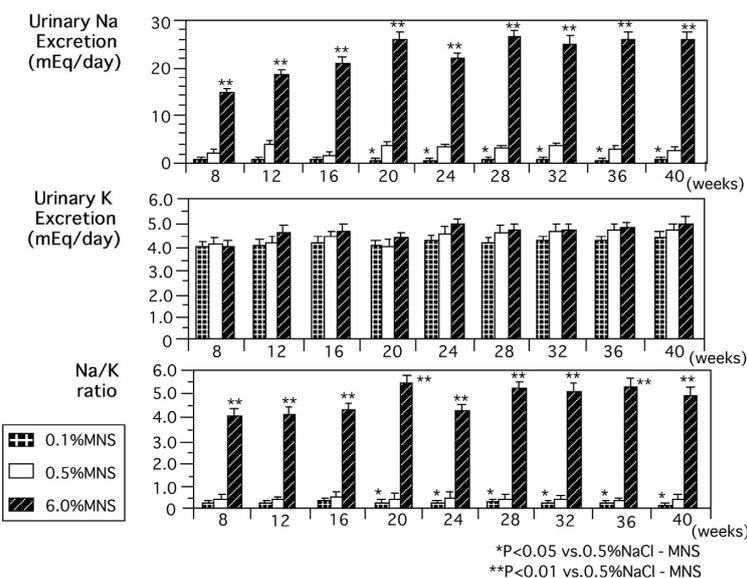


Fig. 3. Changes in urinary excretion of sodium (Na), potassium (K) and Na/K ratio with low- or high-salt diet treated MNS. Values are expressed as means±SEM. \*\*P<0.01, \*P<0.05, statistically significant difference compared with normal-salt diet group.

## (4) R-A系および生化学データの変化

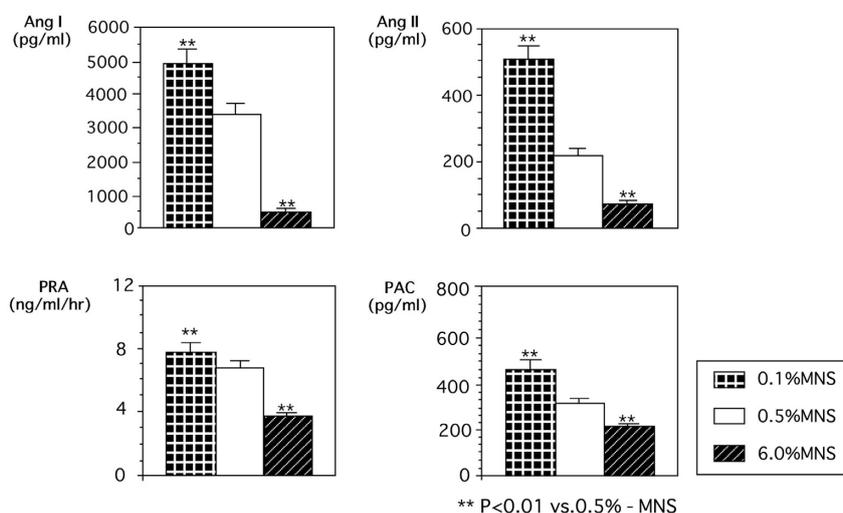
血漿Ang Iは、正塩食群は $3258.6 \pm 308.9$  pg/ml、減塩食群は $4980.5 \pm 450.8$  pg/mlと有意な亢進を認め、加塩食群は $362.4 \pm 35.6$  pg/mlと有意な抑制を認めた。Ang IIは、正塩食群が $222.5 \pm 20.2$  pg/ml、減塩食群は $490.5 \pm 45.4$  pg/mlと有意な亢進を認め、加塩食群は $68.5 \pm 6.5$  pg/mlと著しい抑制を認めた。PACは正塩食群が $332.8 \pm 30.2$  pg/ml、減塩食群では $448.2 \pm 40.2$ と有意な亢進を認め、加塩食群は $242.6 \pm 15.7$  pg/mlと有意な抑制を認めた。PRAは正塩食群が、 $6.6 \pm 0.4$  ng/ml/hr、減塩食群は $7.8 \pm 0.7$  ng/ml/hrと有意な上昇を認め、加塩食群は $3.7 \pm 0.2$  ng/ml/hrと有意な抑制を認めた (Fig. 4)。血清Na, K, Cl濃度は3群間で有意差は認めなかったが、Crtmn値は減塩食群で上昇を認めた (Table 1)。

意差は認めなかったが、Crtmn値は減塩食群で上昇を認めた (Table 1)。

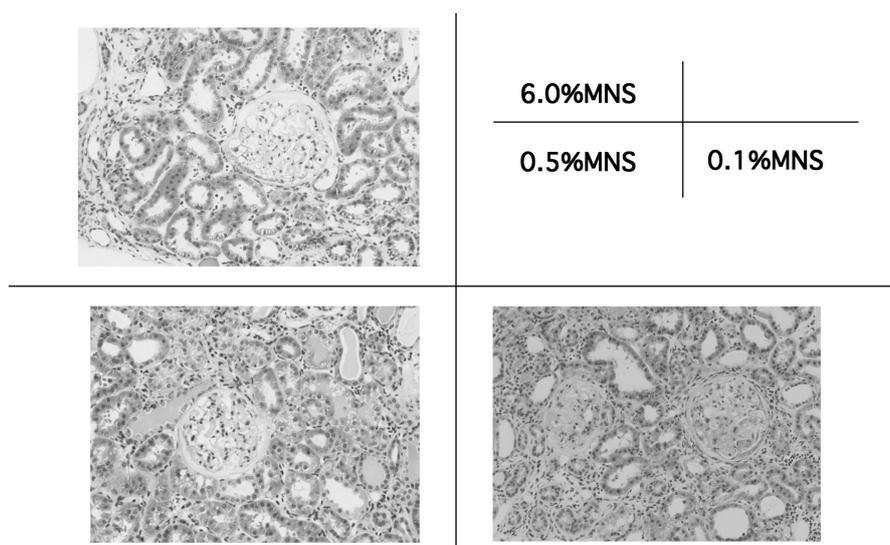
## (5) 腎臓病理所見

正塩食群で糸球体の硬化 (Sclerosis Index :  $2.0 \pm 0.16$ ) ならびに間質の線維化、尿細管障害および間質への細胞浸潤を認めた (Interstitial cell infiltration score :  $558 \pm 47$ )。それは、減塩食群で増悪 (Sclerosis Index :  $2.3 \pm 0.18$ ,  $P < 0.05$ , Interstitial cell infiltration score :  $607 \pm 51$ ,  $P < 0.05$ ) を、加塩食群で改善 (Sclerosis Index :  $1.6 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ . Interstitial cell infiltration score :  $310 \pm 26$ ,  $P < 0.05$ .) を認めた (Fig. 5, 6)。

(6) 腎臓におけるAT1a受容体, AT2受容体, ecNOS, HO-1mRNAの発現



**Fig. 4.** Effects of low- or high-salt diet on plasma renin-angiotensin system level in MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , statistically significant difference compared with normal-salt diet group.



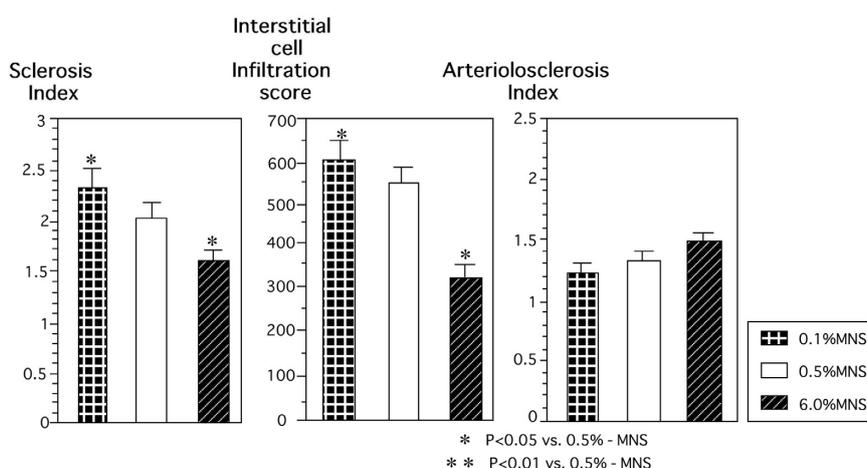
**Fig. 5.** Pathological changes of glomerulosclerosis and interstitial nephropathy in low- or high-salt diet treated MNS. Marked glomerulosclerosis and interstitial cell infiltration were found in low-salt diet treated group. Glomerular changes were significantly ameliorated by high-salt diet treatment.

AT1a受容体mRNAの発現は、正塩食群が $0.98 \pm 0.07$ であったのに対し、減塩食群では $1.05 \pm 0.08$ 、加塩食群では $1.08 \pm 0.09$ と有意な差は認められなかった。AT2受容体mRNAの発現は、正塩食群が $0.34 \pm 0.02$ であったのに対し、減塩食群では $1.28 \pm 0.11$ と有意な発現の亢進を認め、加塩食群では発現は殆ど認められなかった。ecNOSmRNAの発現は、正塩食群が $1.10 \pm 0.07$ であったのに対し、減塩食群では $1.08 \pm 0.09$ 、加塩食群では $1.01 \pm 0.07$ と有意な差を認めず、HO-1mRNAの発現は、正塩食群が $1.18 \pm 0.10$ であったのに対し、減塩食群では $1.19 \pm 0.08$ 、加塩食群では $1.06 \pm 0.09$ と有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

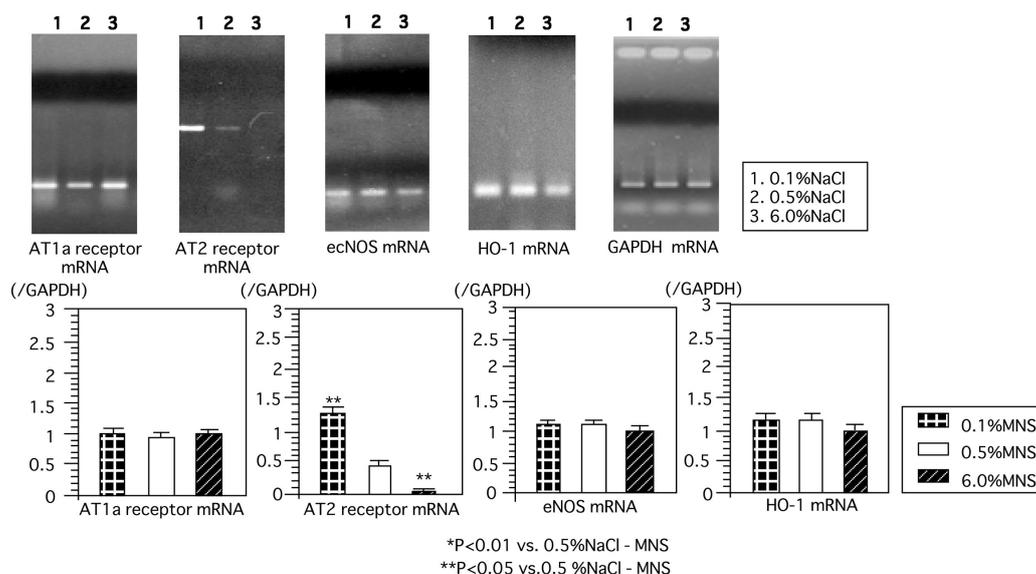
実験2. Milan normotensive ratの腎障害進展におよぼすR-A系の関与

#### (1) 体重および血圧の経時的変化

体重の変化は、placebo群は8週齢で $178.2 \pm 8.5$  gが40週齢で $278.4 \pm 17.2$  g、ACEI群は8週齢で $180.8 \pm 9.5$  gが40週齢で $268.5 \pm 20.2$  g、ARB群は8週齢で $186.5 \pm 9.3$  gが40週齢で $291.7 \pm 22.8$  gと有意な差は認められなかった。血圧の経時的変化は、40週齢でplacebo群が $138.6 \pm 12.1$  mmHgなのに対し、ARB群が $125.8 \pm 10.3$  mmHg、ACEI群は $121.8 \pm 10.4$  mmHgとplacebo群に対して有意な低下が認められた (Fig. 8)。



**Fig. 6.** Changes in sclerosis index, interstitial cell infiltration score and arteriosclerosis index with low- or high-salt diet in MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01, \*P<0.05, statistically significant difference compared with normal-salt diet group.



**Fig. 7.** Expressions of AT1a mRNA, AT2 mRNA, eNOS mRNA and HO-1 mRNA analyzed by semi-quantitative RT-PCR. RNA was isolated from kidney in MNS. Lane 1 showed low-salt diet group, lane 2 showed normal-salt diet group and lane 3 showed high-salt diet group. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01, \*P<0.05, statistically significant difference compared with normal-salt diet group.

## (2) 尿量および尿蛋白排泄量の経時的変化

尿量は3群間で有意な差は認められず、40週齢で、placebo群は $11.5 \pm 1.0$  ml/day, ACEI群は $9.8 \pm 0.8$  ml/day, ARB群は $12.8 \pm 1.2$  ml/dayであった。

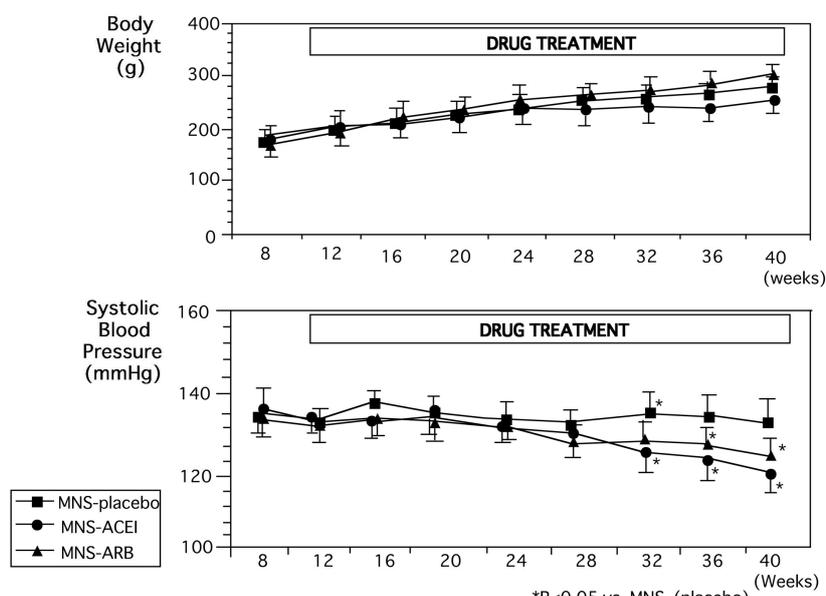
尿蛋白排泄量では、placebo群が $498.6 \pm 30.3$  mg/day, ACEI群では $280.8 \pm 15.2$  mg/dayと有意な低下を認め、一方、ARB群では $487.6 \pm 26.5$  mg/dayと尿蛋白排泄量の有意な低下は認められなかった (Fig. 9)。

## (3) R-A系および生化学的变化

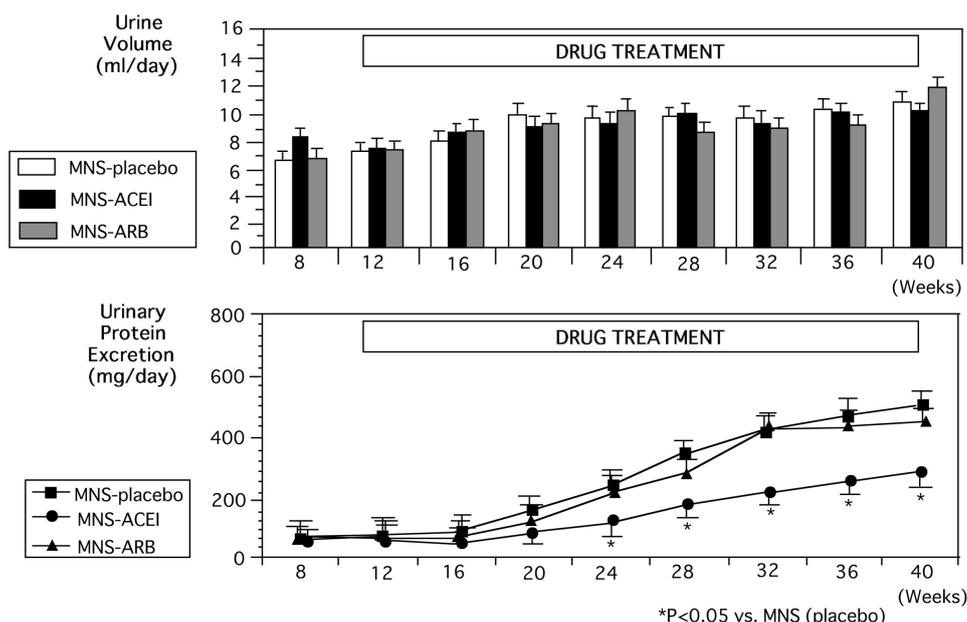
血漿Ang Iは、placebo群が $3150.1 \pm 303.2$  pg/ml, ACEI群は $4567.5 \pm 438.2$  pg/mlと有意な上昇を認め、

ARB群は $2250.4 \pm 210.6$  pg/mlと低下を認めた。Ang IIは、placebo群が $208.3 \pm 18.5$  pg/ml, ACEI群は $60.4 \pm 6.1$  pg/mlと有意な低下を認め、ARB群は $525.8 \pm 48.2$  pg/mlと著明な亢進を認めた。PACはplacebo群が $318.6 \pm 29.7$  pg/ml, ACEI群は $298.3 \pm 27.8$  pg/ml, ARB群は $307.2 \pm 28.8$  pg/mlであり、PRAは、placebo群が $6.3 \pm 0.2$  ng/ml/hr, ACEI群が $6.6 \pm 0.4$  ng/ml/hr, ARB群は $6.8 \pm 0.5$  ng/ml/hrと、有意な差を認めなかった (Fig. 10)。

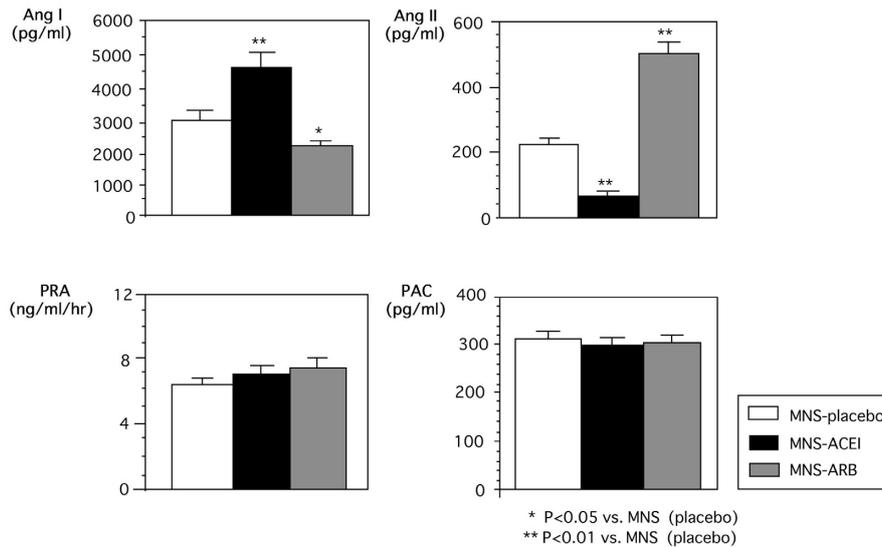
血清Na, K, Cl濃度およびCrtnn, BUN値は3群間で有意な差は認められなかった (Table 1)。



**Fig. 8.** Effects of oral administration of ACEI or ARB on systolic blood pressure (SBP) and body weight in MNS. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , statistically significant difference compared with placebo group at identical times.



**Fig. 9.** Effects of oral administration of ACEI or ARB on urinary excretion of protein and urine volume in MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , statistically significant difference compared with placebo group at identical times.



**Fig. 10.** Effects of oral administration of ACEI and ARB on plasma renin-angiotensin system in MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , statistically significant difference compared with placebo group.

**Table 1.** (a) Changes in serum sodium (Na), potassium (K), chloride (Cl), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Crtnn) in low- and high-salt diet treated MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. + $P < 0.05$ , statistically significant difference compared with normal-salt diet group. (b) Changes in serum sodium (Na), potassium (K), chloride (Cl), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Crtnn) in ACEI and ARB treated MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM.

(a)	Na(mEq/L)	K(mEq/L)	Cl(mEq/L)	BUN(mg/dl)	Crtnn(mg/dl)
0.5%NaCl-MNS	142.7 $\pm$ 2.0	4.0 $\pm$ 0.3	109.6 $\pm$ 0.08	22.9 $\pm$ 3.0	0.4 $\pm$ 0.08
0.1%NaCl-MNS	140.4 $\pm$ 2.0	3.9 $\pm$ 0.3	110.2 $\pm$ 0.12	29.5 $\pm$ 2.8	1.2 $\pm$ 0.11+
6.0%NaCl-MNS	142.4 $\pm$ 2.8	4.5 $\pm$ 0.2	108.5 $\pm$ 0.07	21.6 $\pm$ 3.6	0.2 $\pm$ 0.06

(b)	Na(mEq/L)	K(mEq/L)	Cl(mEq/L)	BUN(mg/dl)	Crtnn(mg/dl)
0.5%MNS(placebo)	141.8 $\pm$ 2.0	4.2 $\pm$ 0.4	107.8 $\pm$ 0.05	20.5 $\pm$ 3.1	0.5 $\pm$ 0.08
0.5%MNS+ACEI	142.2 $\pm$ 2.1	4.6 $\pm$ 0.2	106.6 $\pm$ 0.06	17.7 $\pm$ 2.9	0.3 $\pm$ 0.08
0.5%MNS+ARB	143.2 $\pm$ 2.0	4.8 $\pm$ 0.5	111.6 $\pm$ 0.08	24.4 $\pm$ 2.2	0.8 $\pm$ 0.12

+  $P < 0.05$  vs. 0.5%NaCl-MNS

#### (4) 腎臓病理所見

placebo群に対し、ARB群では糸球体硬化、間質の線維化ならびに間質への細胞浸潤の改善は認めず (placebo群: Sclerosis Index : 2.1  $\pm$  0.16, Interstitial cell infiltration score : 516  $\pm$  48, ARB群: Sclerosis Index: 2.2  $\pm$  0.18, Interstitial cell infiltration score : 538  $\pm$  42), 一方, ACEI群では有意な改善を認めた (ACEI: Sclerosis Index : 1.8  $\pm$  0.08, Interstitial cell infiltration score : 318  $\pm$  25) (Fig. 11, 12).

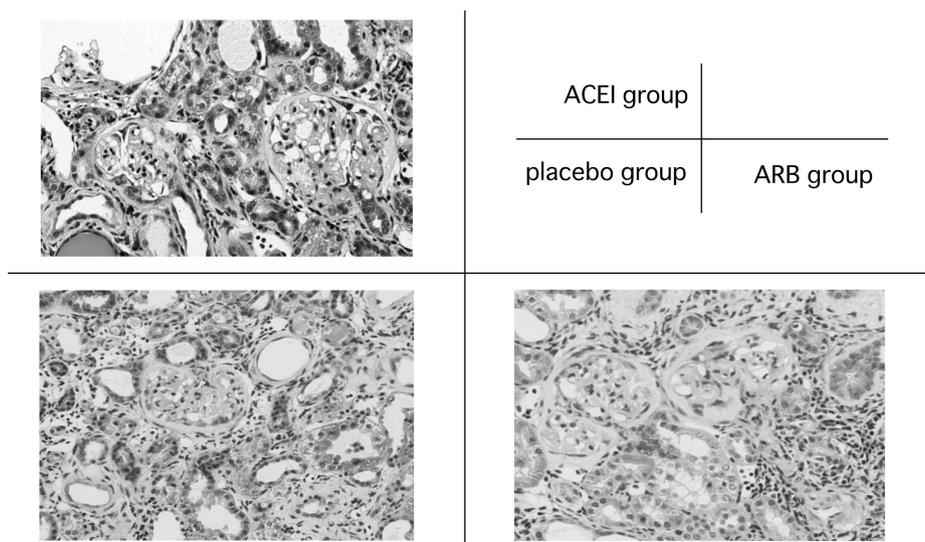
#### (5) 腎臓における各種mRNAの発現

AT1a受容体mRNAは、placebo群が0.81  $\pm$  0.07, ACEI群は0.68  $\pm$  0.05, ARB群は0.72  $\pm$  0.06であり有意な差は認められなかった。AT2受容体mRNAの発現は、placebo群が0.32  $\pm$  0.02, ACEI群は1.78  $\pm$  0.14, ARB群は0.28  $\pm$  0.02とACEI群にて有意な亢進

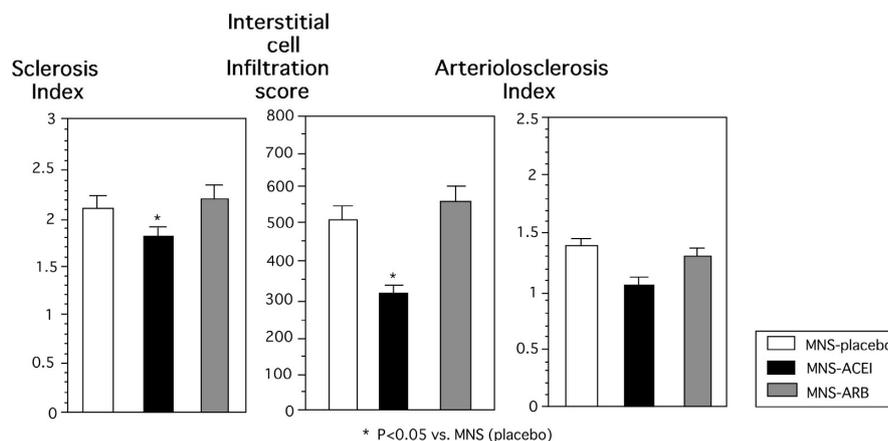
を認めた。eNOSmRNAは、placebo群が1.11  $\pm$  0.10, ACEI群は1.35  $\pm$  0.10と有意な亢進を認め、ARB群は0.38  $\pm$  0.03と有意な抑制を認めた。HO-1mRNAは、placebo群が1.09  $\pm$  0.10, ACEI群は1.40  $\pm$  0.12と有意な亢進を認め、ARB群は0.98  $\pm$  0.05と低下傾向を認めた (Fig. 13).

#### 考案

MNSの糸球体硬化症の進展機序について食塩感受性およびR-A系、さらに降圧系としてのNOおよびHOの面から検討を行った。その結果、R-A系の亢進が腎障害を来す主な原因と考えられ、また、それに伴うNOおよびHOの亢進が腎障害の進展を抑制していることが示唆された。MNSにおいてACEIは腎障害の進展を抑制したが、ARBでは腎障害の進展抑制効果は認



**Fig. 11.** Pathological changes of glomerulosclerosis and interstitial nephropathy in ACEI or ARB treated MNS. Marked glomerulosclerosis and interstitial cell infiltration, which were found in the placebo group was significantly ameliorated by treatment of ACEI. On the contrary, there was no significant improvement in ARB treated group.

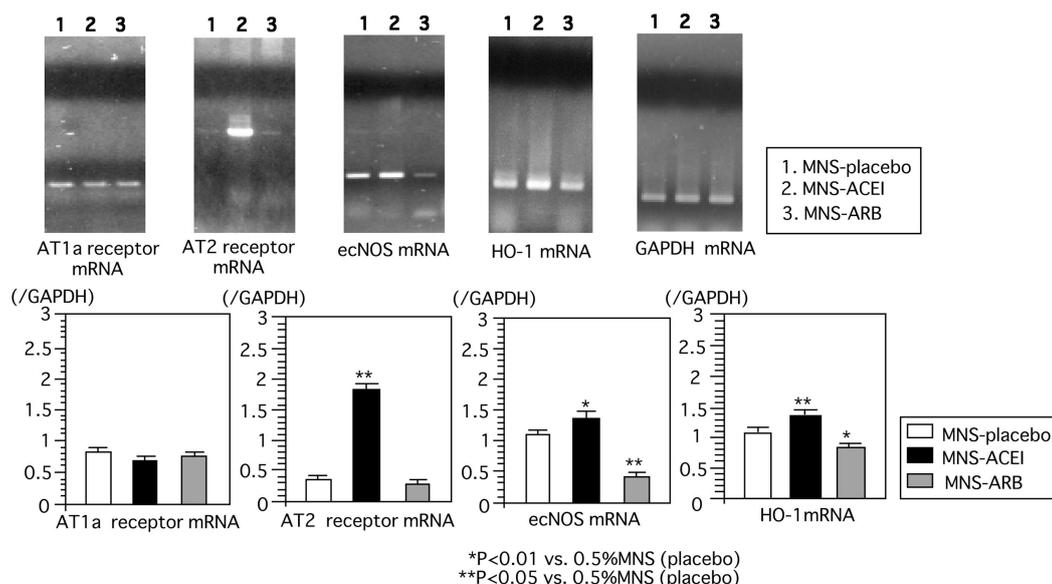


**Fig. 12.** Changes in sclerosis index, interstitial cell infiltration score and arteriolosclerosis index with oral administration of ACEI or ARB in MNS. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01, \*P<0.05, statistically significant difference compared with placebo group.

められなかった。この変化はACEIがNOおよびHOの発現を亢進させ、ARBではNOおよびHOを逆に抑制した変化と一致したことから、ACEIとARBの効果の差は降圧系であるNOおよびHOの変化も、その一因となっている可能性が示唆された。

これまでのMNSに関する報告にもある通り<sup>14-16)</sup>、MNSは、20週齢以後に著明な尿蛋白の増加を認め、40週齢の腎臓では糸球体硬化像ならびに間質の線維化と細胞浸潤の変化を認めた。Floege等<sup>30)</sup>は、電子顕微鏡および各種抗体を用いてMNSの腎障害の進展を組織変化の面から詳細に検討し、3ヶ月で組織学的に足突起の融合が認められ、5ヶ月で糸球体硬化を来すことより「podocyte disease」として報告している。その腎臓病理所見としては、糸球体硬化ならびに間質の

繊維化、細胞浸潤を認めるが、細動脈硬化を殆ど呈さないことが特徴とされており<sup>16,30)</sup>、今回検討を行ったMNSの腎病理所見とほぼ一致するものであった。また腎障害の進展機序として、これまでに幾つかの検討がなされており、Goldstein等は、糸球体においてプロスタグランジン (PG) の一つであるThromboxane (TX) A<sub>2</sub>の発現の亢進が認められ、TXA<sub>2</sub>を投与することによって糸球体硬化は進行し、TX合成酵素を阻害することで糸球体硬化の進展が抑制されることから、アラキドン酸カスケード系の関与、ならびに、高コレステロール状態で糸球体硬化が進行し、fish oilを摂取することで抑制され、蛋白尿の出現時期に一致して高脂血症が出現することを報告している<sup>17)</sup>。また、MNSの培養メサンジウム細胞を用いた*in vitro*の実験にお



**Fig. 13.** Expressions of AT1a mRNA, AT2 mRNA, ecNOS mRNA and HO-1 mRNA analyzed by semi-quantitative RT-PCR. RNA was isolated from kidney in MNS. Lane 1 showed placebo group, lane 2 showed ACEI group and lane 3 showed ARB group. Values are expressed as means $\pm$ SEM. \*\*P<0.01, \*P<0.05, statistically significant difference compared with placebo group.

いて、高血糖状態では糸球体の硬化が進行すること<sup>18)</sup>が報告されており、これらの病態の進展には高脂血症や高血糖などの代謝系の異常の関与も示唆されている。以上のように、MNSは高血圧症を伴わずに腎障害の進展を見ることから、高血圧以外の糸球体硬化の進展機序を明らかにするのに極めて有用なモデルと考えられた。

まず、MNSの糸球体硬化症および間質性病変の進展機序を検討するために、食塩感受性およびR-A系の関与の面から検討を行った。その結果、減塩食にて血圧の変化は認めないが、R-A系は有意に亢進し、尿蛋白排泄量の増加および腎臓の糸球体硬化、間質性病変の増悪が認められ、加塩食にて血圧変化は認めないがR-A系は抑制され、尿蛋白排泄量の低下および腎臓の糸球体硬化、間質性病変の改善が認められた。一方、NOおよびHOといった降圧系においては減塩および加塩では有意な変化は認められなかった。この減塩によるR-A系の著明な亢進は循環体液量の減少に伴う糸球体血流の低下によるものと考えられ、これが攻撃因子として腎臓に作用している可能性が示唆された。つまり、このR-A系の亢進が、MNSにおける腎臓の糸球体硬化ならびに間質性病変の進展をもたらしている可能性が示唆された。

一方、R-A系の阻害薬であるACEIとARBは、腎臓糸球体の輸出細動脈を選択的に拡張させることから、糸球体内圧を減少させ糸球体硬化の進展予防に有用であると報告されている<sup>31,32)</sup>。それが、MNSにおいてどのように作用しているのかについての報告はこれまで

ほとんどないが、Kliem等<sup>33)</sup>が、MNSに血圧を低下させない程度の低容量のACEI (Captopril)の長期投与することにより、低容量のACEIは糸球体障害の進行に影響を与えないとしており、腎臓障害の進展にR-A系の関与しない腎血行動態の影響を報告している。しかし、それ以外の検討はこれまでになされていないため、MNSの腎臓障害の進展におけるR-A系の影響を明らかにする目的で、ACEI (Delapril)およびARB (CV116)を用いてR-A系を抑制することによる腎臓障害の変化を検討した。その結果、ACEI群では有意な尿蛋白の減少を認め、腎病理組織像の改善を認めた。一方、ARB群では尿蛋白は減少せず、腎病理組織像の改善を認めなかった。その理由として、いずれもR-A系を同様に阻害すること、さらに降圧効果では有意な差を認めなかったことからR-A系ならびに血圧以外の関与の可能性が考えられた。そこで、ACEIおよびARBの投与により降圧系であるNOおよびHOがどのように動くかを検討した。その結果、ACEI群においては、ecNOS、HO-1 mRNAの有意な発現亢進を認めたが、ARB群においては逆にそれらの抑制が認められた。すなわち、ACEI投与によりAngIIの発現が抑制される上に、NOならびにHOの亢進が認められ、一方、ARB投与ではAng IIは抑制されたものの、NOおよびHOも抑制を認めた。NOの心血管系ならびに腎臓の保護作用<sup>34,35)</sup>、HOの腎における組織保護作用はすでに報告されており<sup>36)</sup>、ACEI群では、攻撃因子としてのR-A系の抑制と防御因子としてのNOおよびHOの亢進が腎保護作用に働き、その結果、腎病理像の改善を来していると考え

えられ、ARB群で腎病変の改善効果が不良であったことは、R-A系が抑制されたものの、NOおよびHOの抑制が影響している可能性が示唆された。すなわち、Wistar rat<sup>37)</sup>やMHS<sup>15)</sup>に比べ、MNSのように先天的にR-A系の亢進しているモデルにおいては、AngII(攻撃因子)の抑制だけではなく、NOやHO(防御因子)の亢進という、両者の相互作用により初めて腎保護作用を来すのではないかと考えられ、MNSでは、R-A系が腎臓に対する攻撃因子として働き、防御因子としてのNOおよびHOが先天的に亢進している可能性が示唆された。したがって、このようなモデルにおいては、ACEIの方がより腎臓の保護作用の面では優れているのではないかと考えられた。

NOは細胞間伝達物質として循環系のみならず免疫系でも重要な役割を果たしていると言われており、血管系においては、内皮由来弛緩因子(endothelium-derived relaxing factor;EDRF)としてだけでなく、血管拡張神経の伝達物質としても生理的な循環調節因子として関与していることが報告されている<sup>38,39)</sup>。

一方、もう一つの血管拡張物質として知られている一酸化炭素(CO)も重要な循環調節因子であり、HOを律速段階酵素とした反応によって産生され、それには、ストレス応答で誘導されるHO-1と、構成型のHO-2が知られている<sup>36)</sup>。また、腎臓においては虚血により酸素欠乏のストレスを加えることや虚血再還流腎においてHO-1の発現の増加を認め、HOの腎における役割は現在までの所cGMPを介した血管拡張作用、組織保護作用を示すことが知られている<sup>36)</sup>。さらに、HOはAngIIにより誘導され、AngIIによる腎臓障害に対して保護的に働き、AngII投与に伴う腎機能の低下がHO促進薬であるHemin投与により改善することが2000年にAizawaらにより報告されている<sup>40)</sup>。

また、ACEI群におけるecNOSの発現の亢進は、ACEがbradykinin分解酵素であるkininaseであることから、ACEI投与に伴うbradykinin分解抑制に伴うものと考えられた。kinin-kallikrein系の亢進は、NOの増加、血管拡張性プロスタグランジンの増加<sup>41)</sup>、さらにHO-1の増加<sup>42)</sup>をもたすだけでなく、bradykininの心臓保護作用<sup>43)</sup>、腎臓に対するACEIの腎臓保護作用の一部にはkinin-kallikrein系の亢進が関与していることが報告されている<sup>35)</sup>。一方、ARBでは、ARB投与に伴うAngIIのAT2受容体刺激の作用からNOが上昇するとの報告も見られるが<sup>44,45)</sup>、今回の結果では、ACEIであるDelaprilは腎臓におけるNOならびにHOの発現を有意に上昇させ、ARBであるCV116は逆にその発現を減弱させたことから、ARBとACEIの腎障

害の進展抑制の差の一因としてこのNOおよびHOの抑制が影響している可能性が示唆された。

糸球体硬化症は、DOCA食塩高血圧ラット<sup>46)</sup>、puromycin aminonucleoside腎症ラット<sup>47)</sup>、糖尿病モデルラット<sup>48)</sup>など、種々のモデルにおいて同様な所見を示すことが報告されている。糸球体硬化の進展にはR-A系の亢進が重要で、R-A系の抑制がその進展抑制に有用であり、これまでもKatsumataら<sup>28)</sup>は、5/6腎摘自然発症高血圧ラット(SHR)においてカプトプリルは糸球体硬化の進展を抑制したことを報告しており、Ohishi<sup>49)</sup>らもR-A系の抑制されているAdriamycin負荷DOCA食塩高血圧ラットにおける糸球体硬化の進展がACE阻害薬の投与により抑制されることを報告している。これらのラットでは、全身血圧の上昇、さらに糸球体の過剰濾過(Hyperfiltration)やR-A系の亢進に伴う糸球体の内圧上昇が糸球体の硬化病変をすすめる一つの原因であり、それに対して種々の降圧薬で全身血圧および糸球体内圧を下降させることで、糸球体硬化の進展が予防できるとされている<sup>28)</sup>。これらの血行動態を介した直接の糸球体への作用の他にも、AngIIにはメサンジウム細胞の増殖作用<sup>50,51)</sup>、collagen type Iの産生増加作用<sup>52)</sup>、TGF- $\beta$ などのサイトカイン増加を介した作用<sup>53)</sup>、さらに直接の血管平滑筋増殖作用<sup>54)</sup>などが糸球体硬化を引き起こしていることも知られており、その作用機序からR-A系阻害薬は腎障害進展抑制に有効であるが、一方で、ACEIとARBの有用性については差がないことが報告されている<sup>55,56)</sup>。しかしACEIとARBには、1) kinin-kallikrein系への影響、2) AT2受容体刺激作用、3) 代謝産物の影響、(すなわちACEIではAng Iの上昇やAng-(1-7)の上昇が知られている<sup>57,58)</sup>)、4) 腎臓代謝と肝臓代謝の差、さらに5) 脂溶性と水溶性の差等、いくつかの違いが認められている<sup>59,60)</sup>。その意味では、ACEIとARBはR-A系の抑制以外には多くの差を有しており、病態によっては効果にも差がでることは十分に考えられる。MNSはR-A系が亢進し、加齢に伴い腎臓障害の進展が見られるモデルであり、ACEIはNOおよびHOを刺激し腎障害の進展が抑制されたが、ARBでは十分な腎臓障害の進展抑制効果は認められなかった。これまでの報告では、ACEIとARBの血圧ならびに腎臓障害に及ぼす影響については同等とする報告が多く、腎臓障害の進展に差があるとする報告は認められない<sup>61)</sup>。しかし、近年心不全の進行にはAT2受容体の刺激が重要な役割を担っており、AT2受容体刺激は心不全の進展に作用しているとする報告も認められ<sup>62)</sup>、病態によってはACEIとARBで、その作用に差が見られる可能性も示唆される。今回の結果は、腎臓障害の進展に及ぼ

す影響という点でACEIとARBの作用の違いを明らかにした点においても、非常に興味のもてるものと思われた。このモデルラットは臨床の現場における、加齢に伴う腎臓障害進展の一つのモデルとして考えられるが、このラットにおいてACEIとARBの効果について差が見られたことは、実際、臨床の現場においても同様な可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられた。また、これまでにAngiotensin II受容体拮抗薬として知られているLosartan, Valsartan, Irbesartan等はイミダゾール骨格型を持つ競合型拮抗薬として知られており、一方、今回用いたCV116;candesartan cilexetilはベンズイミダゾールの7位にカルボン酸を導入したイミダゾール変型骨格を持つ非競合型拮抗薬である<sup>63)</sup>。これは、他のARBに比して持続的に血中濃度が保たれ、Ang II拮抗作用をより強力に持続させる作用が報告されている<sup>64)</sup>。これまでに、CV116と他のARBとの構造上の相違が、腎臓や心血管系にどのような影響を及ぼすのかについての報告はなく、今後、その点についても検討する必要があると思われた。

今回、私はMNSの糸球体硬化症の進展機序について食塩感受性およびR-A系、さらに降圧系としてのNOおよびHOの面から検討を行った。その結果MNSではR-A系の著明な亢進とそれに伴うNOおよびHOの亢進を認め、R-A系の亢進が腎障害を来している主な原因であり、それに伴うNOおよびHOの亢進が腎障害の進展を抑制している可能性が示唆された。またこの腎障害モデルラットにおける腎保護作用の効果で、ACEIとARBにおいて明らかな差が認められた。

## 結 論

- 1) 高血圧症を伴わず糸球体硬化症を発症することが知られているMNSを用いて、糸球体硬化症の発症進展に関与する種々の因子の関与を体液性因子としてR-A系、さらに降圧系としてNOならびにHOの面から検討を行った。
- 2) MNSでは、20週齢以後の著明な蛋白尿の出現を認めた。
- 3) MNSでは、減塩、加塩に伴う有意な血圧の変化は認められなかった。
- 4) MNSでは有意なR-A系の亢進を認めた。このR-A系の変化は正塩食群と比較し、減塩食群で一層の亢進を、加塩食群では抑制を認めた。一方、減塩加塩ではecNOSmRNAおよびHO-1mRNAの発現に有意な変化を認めなかった。
- 5) MNSでは40週齢時、糸球体硬化ならびに間質性病変を認めた。この変化は減塩食群で有意な増悪を、加塩食群で改善を認めた。

6) ACEIおよびARBはいずれも有意な血圧の低下を認めたが、腎障害においてはACEIの投与に伴い改善を、ARBでは腎障害の有意な改善は見られなかった。

7) 腎臓におけるHO-1 mRNAおよびecNOSmRNAの発現はACEIの投与により増強を、一方ARBの投与により抑制を認めた。

8) MNSではR-A系の著明な亢進とNOおよびHOの亢進を認め、R-A系の亢進が腎障害を来している主な原因であり、それに伴うNOおよびHOの亢進が腎障害の進展を抑制している可能性が示唆された。

9) この腎障害モデルラットにおける腎保護作用の効果で、ACEIとARBにおいて明らかな差が認められた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました埼玉医科大学腎臓内科鈴木洋通教授に深謝致します。また直接御指導を下さいました同教室中元秀友助教授に深謝致します。この内容は第2回日本心血管内分泌代謝学会(1998京都)、第42回日本腎臓学会総会(1999横浜)、第72回日本内分泌学会総会(1999横浜)、第4回Vascular Medicine学会(1999大阪)、第22回日本高血圧学会総会(1999高松)、第3回日本心血管内分泌学会(1999東京)、第43回日本腎臓学会総会(2000名古屋)、第23回日本高血圧学会総会(2000福岡)において発表した。

## 文 献

- 1) Insua JT, Sacks HS, Lau TS, Lau J, Reitman D, Pagano D, Chalmers TC. Drug treatment of hypertension in the elderly: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 1994;121:355-62.
- 2) Samiy AH. Renal disease in the elderly. *Med Clin North Am* 1983;67:463-80.
- 3) Mancia G : The dilemma of benign nephrosclerosis. The hypertensiologist's view. *Am J Kidney Dis* 1993 ; 21 (Suppl 2) : 84-6.
- 4) 日本透析医学会統計調査委員会 同小委員会 中井 滋, 新里 高弘, 佐中 孜, 菊池 健次郎, 北岡 建樹, 篠田 俊雄, 他. わが国の慢性透析療法の現況(1999年12月31日現在) 透析会誌 2001;34:1-31.
- 5) Anderson S, Brenner BM: Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 1986;80:435-42.
- 6) Zucchelli P, Zuccala A. Progression of renal failure and hypertensive nephrosclerosis. *Kidney Int* 1998;68 (Suppl):S55-9.
- 7) Zucchelli P, Zuccala A. Recent data on hypertension

- and progressive renal disease. *J Hum Hypertens* 1996;10:679-82.
- 8) Whelton P, Klag M. Hypertension as a risk factor for renal disease : Review of clinical and epidemiological evidence. *Hypertension* 1989;13(suppl I):I-19-27.
  - 9) Ono H, Ono Y. Nephrosclerosis and hypertension. *Med Clin North Am* 1997;81:1273-88.
  - 10) Freedman B, Iskandar S, Appel R. The link between hypertension and nephrosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1995;25 :207-21.
  - 11) Weir MR. Hypertensive nephropathy : is a more physiologic approach to blood pressure control an important concern for the preservation of renal function? *Am J Med* 1992;93:27S-37S.
  - 12) Huysmans FT, Wetzels JF. Intensive treatment of blood pressure in patients with kidney disease and proteinuria. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000;144:2085-8.
  - 13) Ritz E, Orth SR, Strzelczyk P. Angiotensin converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, and their combination in the treatment of glomerular disease. *J Hypertens Suppl* 1997;15:S21-6.
  - 14) Bianchi G, Baer PG. Characteristics of the Milan hypertensive strain (MHS) or rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1976;Suppl 3:15-20.
  - 15) Bianchi G, Fox U, Imbasciati E. Development of a new strain of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1974;14:339-47.
  - 16) Brandis A, Bianchi G, Reale E, Helmchen U, Kuhn K. Age-dependent glomerulosclerosis and proteinuria occurring in rats of the Milan normotensive strain and not in rats of the Milan hypertensive strain. *Lab Invest* 1986;55:234-43
  - 17) Goldstein DJ, Wheeler DC, Sandstrom DJ, Kawachi H, Salant DJ. Fish oil ameliorates renal injury and hyperlipidemia in the Milan normotensive rat model of focal glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:1468-75.
  - 18) Pugliese G, Pricci F, Mene P, Romeo G, Nofroni I, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Di Mario U, Pugliese F. High glucose level unmasks a genetic predisposition to enhanced extracellularmatrix production in mesangial cells from the Milan normotensive strain. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:406-14
  - 19) 渡辺 信子, 牧野 和夫, 亀井 幸子, 大久保 昭行, 山中学, 大沢 進. ピロガロールレッド・モリブデン錯体を用いる蛋白定量と日立 726 型自動分析機への適用 *臨床病理* 1984;32:227.
  - 20) 桑 克彦. イオン選択電極 *臨床検査* 1982;34:1353-8.
  - 21) 大沢 進. 最新臨床化学検査法 クレアチニン *Medical Technology* 1998;26:389-95.
  - 22) Hallett CJ, Cook JGH. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. *Clin Chim Acta* 1971;35:33-7.
  - 23) Iwasawa M, Tokumoto M, Makiishi N, Takatori O. Fundamental evaluation no-extraction of angiotensin I and angiotensin II by radioimmunoassay. *医学と薬学* 1996;36:297-303.
  - 24) 森本 妙子, 青山 正明, 後藤 英司, 塩之入 洋. フロリジル法による plasma angiotensin II の radioimmunoassay の開発と検討. *日内分泌会誌 (Folia Endocrinol Jap)* 1983;59:215-29.
  - 25) 猿田 享男, 斉藤 郁夫, 山上 恵一, 岡 匡嗣, 北島 和一, 小西 考之助, 他. 抽出を要しないアルドステロン Radioimmunoassay Kit の検討 *現代医療* 1997;9:1137-40.
  - 26) 河野 剛. 血漿レニン活性 *日本臨床* 1985;43( 秋期臨時増刊号 ):1108-11.
  - 27) Raiji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, Hypertension and progresive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984;26:137-43.
  - 28) Katsumata H, Suzuki H, Ohishi A, Nakamoto H, Saruta T, Sakaguchi H. Effects of antihypertensive agents on blood pressure and the progress of renal failure in partially nephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* 1990;62:474-80.
  - 29) Nakamoto H, Ferrario CM, Buckalew VM, Suzuki H. Role of nitric oxide in the evolution of renal ischemia in two-kidney, one-clip renovascular hypertension. *Hypertens Res* 1998;21:267-77.
  - 30) Floege J, Hackmann B, Kliem V, Kriz W, Alpers CE, Johnson RJ, et al. Age-related glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in Milan normotensive rats: a podocyte disease. *Kidney Int* 1997;51:230-43.
  - 31) Ito S, Johnson CS, Carretero OA. Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 1991;87:1656-63.
  - 32) Sanders PW. L-arginine and arginine analogs in progressive renal failure. *Blood Purif* 1995;13:219-27.
  - 33) Kliem V, Brunkhorst R, Ehlerding G, Kuhn K, Neumann KH, Koch KM. Prevention of glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis in Milan normotensive rats by low-protein diet, but not by

- low-dose captopril treatment. *Nephron* 1995;71:208-12.
- 34) Rouleau JL, Kapuku G, Pelletier S, Gosselin H, Adam A, Gagnon C, et al. Cardioprotective effects of ramipril and losartan in right ventricular pressure overload in the rabbit – Importance of kinins and influence on angiotensin II type 1 receptor signaling pathway. *Circulation* 2001;104:939-44.
- 35) Liu YH, Yang XP, Mehta D, Bulagannawar M, Scicli GM, Carretero OA. Role of kinins in chronic heart failure and in the therapeutic effect of ACE inhibitors in kininogen-deficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Feb;278:H507-14.
- 36) Suematsu M, Goda N, Suzuki T, Wakabayashi Y, Ishimura Y. ヘムオキシゲナーゼ-CO系による臓器機能制御. *細胞工学* 1998;17:224-9.
- 37) Huang Y, Wang DH. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in salt-sensitive hypertension induced by sensory denervation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H2143-9.
- 38) Wiemer G, Scholkens BA, Becker RH, Busse R. Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension* 1991;18:558-63.
- 39) Vanhoutte PM, Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* 1989;80:1-9.
- 40) Aizawa T, Ishizaka N, Taguchi J, Nagai R, Mori I, Tang S, Ingelfinger JR, Ohno M. Heme Oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II – Induced hypertension rats possible role in renoprotection. *Hypertension* 2000;35:800-6.
- 41) Warren JB, Loi RK. Captopril increases skin microvascular blood flow secondary to bradykinin, nitric oxide, and prostaglandins. *FASEB J* 1995;9:411-8.
- 42) Gryglewski RJ, Chlopicki S, Uracz W, Marcinkiewicz E. Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation. *Med Sci Monit* 2001;7:1-16.
- 43) MacLaughlin M, Monserrat AJ, Muller A, Matoso M, Amorena C: Role of kinins in the renoprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in experimental chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* 1998;21:329-34.
- 44) Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000;35 (1 Pt 2):155-63.
- 45) Carey RM, Jin XH, Wang ZQ, Siragy HM. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand* 2000;168:65-71.
- 46) Tikkanen I, Fyhrquist F, Miettinen A, Tornroth T. Autologous immune complex nephritis and DOCA-NaCl load: a new model of hypertension. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1980;88:241-50.
- 47) Grone EF, Walli AK, Grone HJ, Miller B, Seidel D: The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis* 1994;107:1-13.
- 48) Herlein G. Glomerulosclerosis in diabetic animals. *Z Gesamte Inn Med* 1970;25:281-9.
- 49) Ohishi A, Suzuki H, Nakamoto H, Katsumata H, Sakaguchi H, Saruta T. Differences in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a thiol group in chronic renal failure in rats. *Clin Sci (Lond)* 1989;76:353-6.
- 50) Goto M, Mukoyama M, Suga S, Matsumoto T, Nakagawa M, Ishibashi R, et al. Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension* 1997;30 (3 Pt 1):358-62.
- 51) Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997;52:1497-510.
- 52) Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type 1 collagen in cultured murine mesangial cell. *Am J Pathol* 1992;140:95-107.
- 53) Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1999;56:860-72.
- 54) Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Largo R, Lopez-Armada MJ, Plaza JJ, Gonzalez E, et al. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 1996;27:885-92.
- 55) Jover B, Demeilliers B. Angiotensin II type 1 receptor antagonist versus angiotensin I-converting enzyme inhibitor in experimental renal diseases. *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14:541-8.
- 56) Nakamura Y, Ono H, Zhou X, Frohlich ED. Angiotensin type 1 receptor antagonism and ACE inhibition produce similar renoprotection in N(omega)-nitro-L-arginine

- methyl ester/spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001;37:1262-7.
- 57) Ueda S, Masumori-Maemoto S, Wada A, Ishii M, Brosnihan KB, Umemura S. Angiotensin (1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. *J Hypertens* 2001;19:2001-9.
- 58) Souza Dos Santos RA, Passaglio KT, Pesquero JB, Bader M, Simoes E Silva AC. Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 2001;38:660-4.
- 59) Vaz-da-Silva M. Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin II receptor antagonists. Pharmacologic features. *Rev Port Cardiol* 2000;19 (Suppl 2):II19-32.
- 60) Shionoiri H. Pharmacokinetic drug interactions with ACE inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 1993;25:20-58.
- 61) Mackenzie HS, Ziai F, Omer SA, Nadim MK, Taal MW. Angiotensin receptor blockers in chronic renal disease: the promise of a bright clinical future. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 (Suppl 12):S283-6.
- 62) Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 2001;17:247-8.
- 63) Shibouta Y, Inada Y, Ojima M, Wada T, Noda M, Sanada T, et al. Pharmacological profile of a highly potent and long-acting angiotensin II receptor antagonist, 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid (CV-11974), and its prodrug, (+/-)-1-(cyclohexyloxycarbonyloxy)-ethyl 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116). *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:114-20.
- 64) Stoukides CA, McVoy HJ, Kaul AF. Candesartan cilexetil: an angiotensin II receptor blocker. *Ann Pharmacother* 1999 ;33:1287-98.