

正常妊娠ならびに高血圧妊娠個体における angiotensinogen および kininogen mRNA 発現に関する実験的研究

新 谷 敏 昭

愛媛大学医学部産科婦人科学

Expression of angiotensinogen and kininogen mRNA in the pregnant spontaneously hypertensive rat

Toshiaki Shintani

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Ehime University

Summary

The purpose of this study was to investigate the role of the renin-angiotensin (Rn-An) and kallikrein-kinin (Kl-Kn) systems in pregnancy induced hypertension (PIH). Angiotensinogen (AG) and kininogen (KG) mRNA in the liver was measured by the Northern blot hybridization method during pregnancy with or without sodium load in the Wistar-Kyoto rat (WKY) and the spontaneously hypertensive rat (SHR). Systolic blood pressure (BP) was measured by the tail cuff method.

In pregnant WKY without sodium load, BP did not change significantly, and AG and KG mRNA production increased by 87 and 68%, respectively. In the sodium-loaded group, BP did not change significantly, but AG mRNA production increased while KG mRNA decreased.

In the pregnant SHR without sodium load, BP fell to almost normal on the 18th day of pregnancy. AG and KG mRNA production increased by 50 and 177% respectively. However with sodium loading, there was no fall in BP, and AG and KG mRNA production did not change.

In addition, the effects of estradiol (E), progesterone (P) and E-P combination on AG and KG mRNA production were investigated using castrated WKY. All 3 increased AG and KG mRNA production (E-P > E > P).

These findings suggest that the Rn-An and Kl-Kn systems, which could be regulated by sex steroid hormones, play an important role in the homeostasis of systemic circulation during pregnancy. SHR probably lacks the compensatory reaction of the Rn-An and Kl-Kn systems to sodium load.

Key Words

pregnancy, angiotensinogen, kininogen

1995年6月14日受理

愛媛大学医学部産科婦人科学

(諸 言)

妊娠時には胎児育生を目的とした子宮胎盤血行が成立し、母体循環血液量、心拍出量の増加に加え、レニン-アンジオテンシン系 (以下 Rn-An) の亢進が生じる。しかし、正常妊娠個体においては高血圧を招くことなく、むしろ一過性の拡張期血圧の低下が生じるという特徴的な循環動態の発現が知られている。その要因として、妊娠時の系統血管系に生じる血管拡張や Angiotensin II (以下 A II) に対する感受性の低下、いわゆる A II 不応性の成立が挙げられている^{1),4),13),20),33)}。妊娠末期に中毒症を発症する妊婦では、妊娠22週前後よりこの A II 感受性が亢進しはじめ^{6),16),33)}、妊娠末期にいたって高血圧を発症、胎盤、腎、肝をはじめとする各種臓器組織の循環障害からその機能障害を招き、母児の予後に著しい障害を及ぼす。

昇圧系液性調節因子である Rn-An 系と、降圧系因子としてのカリクレイン-キニン系 (Kl-Kn 系) は、アンジオテンシン変換酵素 (キニナーゼ II) を介する密接な関連のもとに生体の血圧調節に深く関わっている。妊娠個体ならびに中毒症妊婦における Rn-An 系の血中変動については多くの報告が見られ、一旦亢進した状態から中毒症の重症化に伴ない Rn-An 系の低下が生じることも知られている^{6),9)}。しかし、妊娠時の血圧調節に関する Rn-An 系と Kl-Kn 系の相互関係、とくに Kl-Kn 系の変動に関しては充分解明されておらず、また中毒症妊婦におけるこれらの変化、病態への関与についてもほとんど知られていない。中毒症妊婦における Kl-Kn 系については尿中カリクレインまたは血漿プレカリクレインの減少について少数の報告がみられるにとどまる^{9),27),30)}。

妊娠あるいは高血圧妊娠個体における Rn-An 系、Kl-Kn 系の変動を基質産生レベルにおいて検討することは、妊婦の循環動態特性や妊娠中毒症の病態を知る上で重要と思われる。よって今回、自然発症高血圧ラット (spontaneous hypertensive rat: SHR) を用いて、対照である正常血圧ラット (Wistar Kyoto rat: WKY) の妊娠時ならびに妊娠 SHR の肝臓におけるアンジオテンシノーゲン (AG) とキニノーゲン (KG) の産生状況を、それぞれの mRNA を測定することにより検定するとともに、両者に食塩負荷を行った際の血圧の変動と AG, KG 産生の変化を検討することにより、妊娠時の血圧調節ならびに妊娠高血圧の病態形成の上での Rn-An 系、Kl-Kn 系の役割を考察した。

また妊娠時における AG, KG 産生がどのような因子により調節されているかを知るために、妊娠時に著しい変動を示す性ステロイドの影響についても検討した。

(対象と実験方法)

実験 1. WKY, SHR 妊娠時の血圧変動と肝における AG, KG 産生について

実験動物として週令11週から14週の WKY と SHR を用いた。非妊対照群として WKY, SHR 各 4 匹を使用し、妊娠動物は WKY 相互, SHR 相互の交配により得られた妊娠 WKY ならびに妊娠 SHR それぞれ 4 匹を妊娠 WKY 群, 妊娠 SHR 群とした。

実験動物は市販の食餌 (ラット飼育用 MF) を自由に摂取せしめた。食餌100g 中に含まれる粗灰分としての Na 量は0.26g である。妊娠各群は、ラット用血圧計を用い、隔日に tail cuff 法により尾動脈収縮期血圧を3回測定、その平均値を記録した。肝臓の摘出は、各群とも妊娠第20日に断頭後に直に行い、液体窒素に浸漬凍結させたのち -70°C にて保存し、AG mRNA, KG mRNA の測定に供した。肝総細胞質 RNA の抽出および精製は Chirgwin らの方法⁹⁾ に準じて行った。すなわち GTC-cesium chloride 法により凍結保存した肝臓を液体窒素下に粉碎し、GTC 溶液中にて homogenate を行い、homogenate 溶液を 5.7M cesium chloride 上に重層、スウィングローター (RPS40T, 日立製作所製) にて超遠心分離 (15°C , $1.0 \times 10^5\text{g}$, 20hr.) し、RNA を精製した。精製した総細胞質 RNA の定量は日立社製分光光度計 (200-20型) を用い、260nm の吸光度測定により算出した。ラット AG のプローベとしては、cDNApRag16 よりアンジオテンシンの3'側のアミノ酸翻訳領域である BamHI 断片 (712bps) を用いた (Fig. 1a)。KG については、ラットでは低分子型、高分子型、T-1 ならびに T-2 の4種類が存在するが¹⁹⁾、今回使用したプローベは全てのキニノーゲン mRNA の検出可能な T-1 キニノーゲン cDNA pRKG29 より T-キニンを含む広

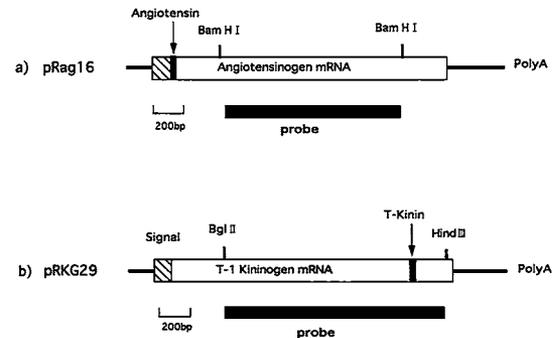


Fig. 1 Schematic representation of the structure of rat angiotensinogen mRNA and kininogen mRNA and each cDNA.

いアミノ酸翻訳領域を持つ Bgl II-Hind III 断片 (903bps) を用いた²¹⁾ (Fig. 1b)。以上の両プローベは、それぞれの cDNA クローンより制限酵素 (宝酒造) で切断し作成したのち、nick-translation 法を用い (α -³²P) dCTP で標識し²⁰⁾、RNA blot hybridization analysis (Northern blotting analysis) に使用した。Nick-translation 法は nick-translation kit (Amersham 製 K.5000) を用い、15°C で 1 時間反応させ、 $2.0 \times 10^8 \sim 3.8 \times 10^8$ cpm/ μ g の比活性を得た。それぞれの精製した総細胞質 RNA を希釈、nylon filter 上に dot blot し、nylon filter を 80°C 3 時間乾燥させて RNA を固定した。次にフィルターを prehybridization 溶液 (Amersham 社製) に浸し 60°C 8 時間 prehybridization を行った後にそれぞれの標識プローベを 20 μ g/ml の濃度で加え、60°C 24 時間 hybridization を施行した。次にナイロンフィルターを $2 \times$ SSC, $1 \times$ SSC, $0.7 \times$ SSC で洗浄、風乾させオートラジオグラフィにて X 線フィルムを感光させた後、感光部の濃度をイメージアナライザー LUZEX III (NIRECO 社製) を使用して測定した (Fig. 2a)。

摘出肝での mRNA 産生量を絶対値として表わすことは困難であるため、フィルター上に積載した総細胞質 RNA 量を X 軸に、測定した mRNA 感光部の濃度を Y 軸に plot して得た回帰直線の傾きを mean slope coefficient

(MSC) として算出、それぞれの MSC を mRNA 発現量の指数として比較した (Fig. 2b)。

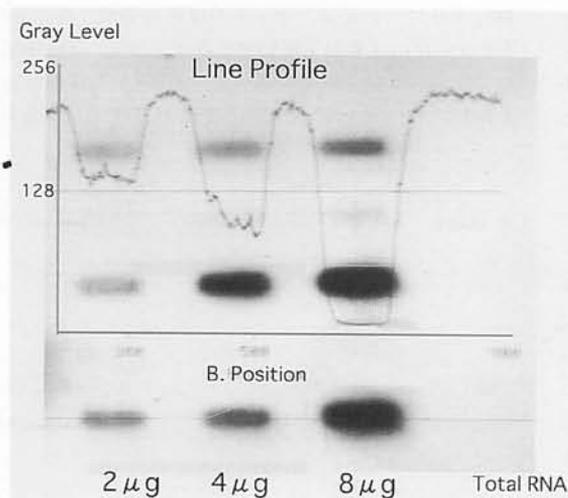
実験 2. 食塩負荷妊娠ラットの血圧の変動と肝における AG, KG 産生について

食塩負荷群としては妊娠 WKY, 妊娠 SHR それぞれ 4 匹をあて、淵氏の方法⁹⁾ に準じ 1.5% 食塩水を妊娠第 5 日より妊娠末期の妊娠第 20 日まで自由飲水せしめることにより食塩負荷を行った。固形食餌は実験 1 と同様に投与し、血圧の測定、肝 AG mRNA, KG mRNA 測定も実験 1 と同様の方法により行った。

実験 3. 性ステロイド投与が卵巣摘出 WKY の肝における AG, KG 産生に及ぼす影響について

週令 11 週から 14 週の雌 WKY 12 匹に予め両側卵巣摘出術を施行した後、各 4 匹よりなる 3 群にわけ、去勢の 3 週間後より毎 5 日に 3 回エストラジオール-17 β (E₂) 500 μ g 単独筋注投与したもの、または同じく 3 回にわたりプロゲステロン (P) 1.25mg 単独筋注投与したもの、また E₂, P それぞれ 500 μ g, 1.25mg を同時に同じく 3 回筋肉内投与したものを、それぞれ E₂ 単独投与群, P 単独投与群, E₂, P 併用投与群とし、いずれも投与終了 3 日後に断頭、肝を摘出して -70°C で保存した (Fig. 3)。AG mRNA, KG mRNA の発現量の測定は実験 1 と同様の方法で行い、去勢のみにて性ステロイド投与を行わない対照群と比較した。

a) Densitometric measurement of dot blot with LUZEX III.



b) Correlation of mean slope coefficients of WKY liver kininogen.

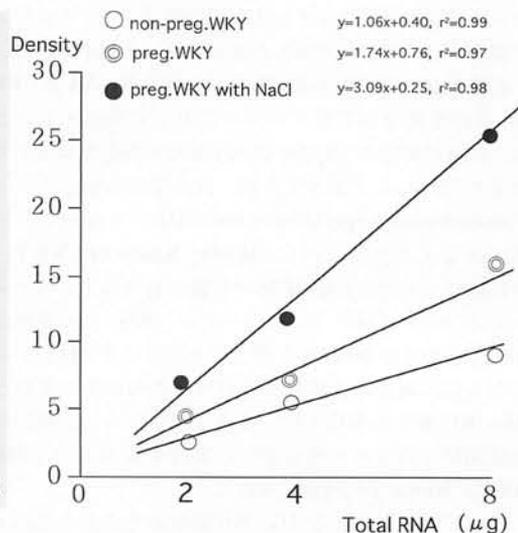


Fig. 2 Measurement of mean slope coefficient (MSC) of liver mRNA in rats.

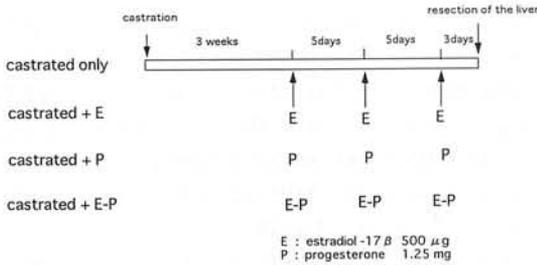


Fig. 3 Protocol for evaluating the effects of estrogen and progesterone on the production of liver AG and KG mRNA in WKY.

実験結果はすべて平均値±標準偏差で表わした。各実験における有意差検定は Mann-Whitney 検定により行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

(成 績)

実験 1. WKY, SHR 妊娠時の血圧変動と肝における AG, KG 産生について

妊娠 WKY の経日的収縮期血圧の変動は、Fig. 4 に示すごとく妊娠第 6 日 $127 \pm 11 \text{ mmHg}$ で以後ほぼ同値を維持し、妊娠第 20 日には $130 \pm 8 \text{ mmHg}$ と非妊時収縮期血圧平均 $129 \pm 5 \text{ mmHg}$ に比し有意の変動は見られなかった。これに対し、SHR の非妊時の血圧は $165 \pm 8 \text{ mmHg}$ と高血圧の状態にあり、妊娠第 6 日では $171 \pm 5 \text{ mmHg}$ と非妊時と大差がみられないが、妊娠第 10 日では $182 \pm 6 \text{ mmHg}$ 、妊娠第 16 日では $194 \pm 12 \text{ mmHg}$ と妊娠経過とともに上昇傾向を示した。しかし第 18 日以後は下降に転じ、妊娠第 18 日には $175 \pm 10 \text{ mmHg}$ 、妊娠第 19 日には $143 \pm 9 \text{ mmHg}$ と著明な下降を示し ($p < 0.05$)、妊娠第 20 日もこれとほぼ同レベルを保った (Fig. 4)。

WKY 妊娠末期の肝臓における AG mRNA の MSC は 3.36 ± 0.46 と非妊時時の 1.80 ± 0.23 に比し 1.87 倍と有意に増加 ($p < 0.05$) している (Fig. 5a)。また、KG mRNA の MSC についても妊娠末期で 1.87 ± 0.14 と非妊時時の 1.14 ± 0.19 に比し 1.68 倍と有意の増加 ($p < 0.05$) を示し、WKY では妊娠末期の AG, KG の産生亢進が認められた (Fig. 5a)。

SHR での非妊時の肝 AG mRNA, KG mRNA の MSC はそれぞれ 0.96 ± 0.12 , 0.64 ± 0.15 と WKY 非妊時に比し明らかに低値であるが、妊娠末期には AG mRNA, KG mRNA とともにそれぞれ 1.44 ± 0.18 , 1.77 ± 0.25 と有意の増加 ($p < 0.05$) を示している (Fig. 5b)。

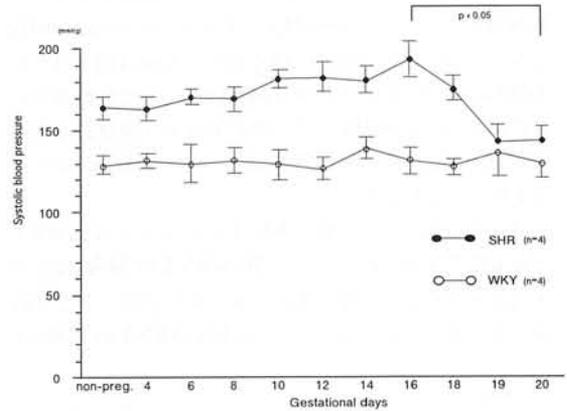


Fig. 4 Changes of systolic blood pressure in pregnant rats.

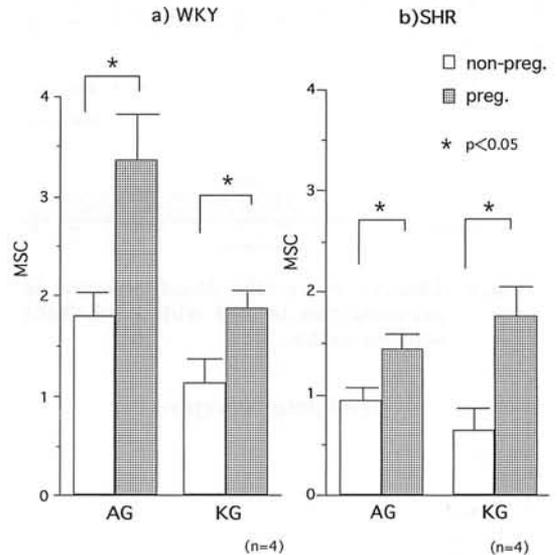


Fig. 5 Effects of pregnancy on liver AG and KG mRNA production in WKY (a) and SHR (b).

それぞれの増加は非妊時の 1.50 倍、2.77 倍であり、特に KG mRNA の増加は妊娠末期 WKY とほぼ同じレベルまでに上昇した。

実験 2. 食塩負荷妊娠ラットの血圧変動と肝 AG, KG 産生について

妊娠 WKY 食塩負荷群では、負荷後第 2 日 (妊娠第 6 日) と第 4 日 (妊娠第 8 日) にそれぞれ $138 \pm 8 \text{ mmHg}$, $128 \pm 10 \text{ mmHg}$ と非妊時の $123 \pm 8 \text{ mmHg}$ に比し軽度の上昇をみたが、以後妊娠 20 日いたるまではほぼ非妊時の値を維持し、有意の変動は見られなかった (Fig. 6)。

妊娠 SHR 食塩負荷群においては、負荷後2日目(妊娠第6日)で 167 ± 5 mmHg と非妊時の 170 ± 12 mmHg と有意差なくほぼ非妊時の値を保ち、負荷後14日目(妊娠第18日)以後軽度の血圧下降傾向を示して妊娠第19日目には 152 ± 14 mmHg となったが有意の下降は認められず、また妊娠 WKY 食塩負時群に比し有意の高血圧状態を保った (Fig. 6)。

食塩負時群での肝 AG, KG 産生については、WKY 妊娠末期で Fig. 7a のごとく AG mRNA の MSC は 1.50 ± 0.21 と非負荷群妊娠末期の 3.36 ± 0.46 に比し著しく低値にとどまり ($p < 0.05$)、一方 KG mRNA の MSC は

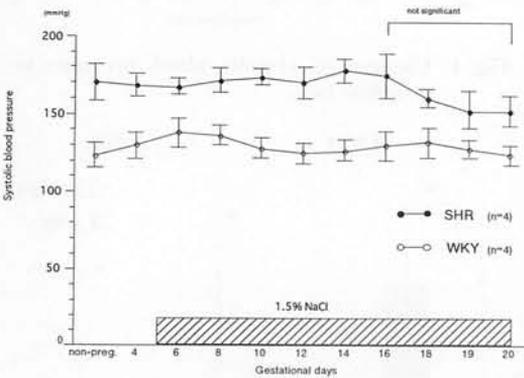


Fig. 6 Changes of systolic blood pressure in pregnant rats treated with 1.5 % NaCl solution intake.

これとは反対に 3.19 ± 0.44 と食塩非負荷群妊娠末期の 1.87 ± 0.14 の1.71倍に達する著明な増加を示した ($p < 0.05$)。

妊娠 SHR に食塩水摂取を行った場合は、妊娠 WKY 食塩負荷の場合にみられた AG の低減や KG の著増はなく、AG mRNA, KG mRNA の MSC はそれぞれ 1.48 ± 0.24 , 1.94 ± 0.31 と SHR 食塩非負荷群妊娠末期とほぼ同値にとどまった (Fig. 7b)。

実験3. 性ステロイド投与が卵巣摘出 WKY 肝 AG,

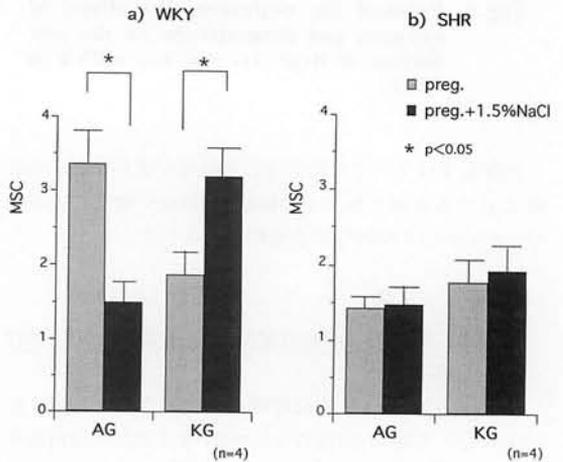


Fig. 7 Effects of 1.5% NaCl solution intake on liver AG and KG mRNA production in pregnant WKY (a) and SHR (b).

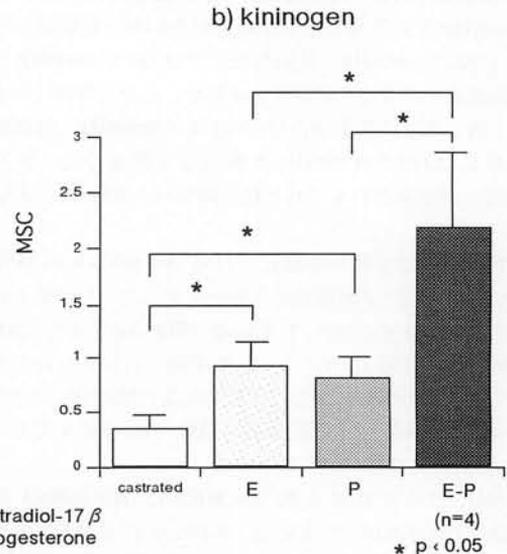
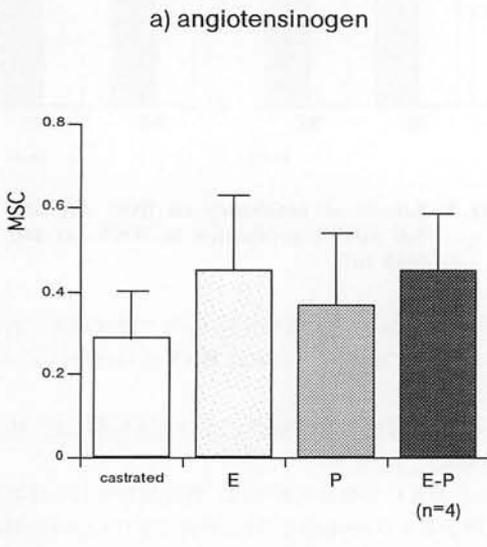


Fig. 8 Effects of Estrogen and progesterone on AG mRNA (a) and KG mRNA (b) production in WKY rat liver.

KG 産生に及ぼす影響について

成熟雌ラット去勢3週間後より E₂ を単独投与した群での AG mRNA の MSC 値は、Fig. 8 のごとく 0.45 ± 0.19 と対照去勢群の 0.29 ± 0.12 に比し増加傾向を示し、P を単独投与した群の場合には 0.37 ± 0.18、E₂、P 両者の同時投与によっては 0.45 ± 0.14 と E₂ 単独投与時とはほぼ同等の増加を示した。一方 KG においては、去勢対照群の MSC 値 0.35 ± 0.10 に比し E₂ 単独投与時には 0.89 ± 0.28、P 単独投与時には 0.80 ± 0.20 といずれも有意の増加を示し (p < 0.05)、さらに E₂、P の同時投与によっては、2.18 ± 0.68 と著明な増加をみた (p < 0.05) (Fig. 8)。

(考 察)

妊娠時には母体循環血液量ならびに心拍出量が比較的に早期より増加をはじめ、妊娠末期には前者では約40%、後者で40~50%の増加を示す。この際、Rn-An系をはじめとする液性血圧調節因子の血中レベルにも著しい変化が生じ、妊娠循環動態の恒常性維持に関与することが推察される。正常妊娠では血漿レニン活性、血漿レニン濃度、血漿レニン基質濃度のいずれにおいても活性の亢進または濃度の増加が知られている^(1,6),21),32)。また妊娠ラットへのアンギオテンシンⅡ(AⅡ)の拮抗物質(Ser¹, Ala⁸) AngiotensinⅡ投与により有意の血圧低下を招くことから、妊娠時におけるRn-An系の亢進が血圧の恒常性維持に重要な役割を果たしているものと推察されている。一方、降圧系であるKl-Kn系はRn-An系とアンギオテンシン変換酵素(KininaseⅡ)を介して血圧調整に密接に関与し、またKininはphospholipase A₂活性を亢進させることにより、血管内皮でのprostaglandin I₂の産生を増加させアンギオテンシンをはじめとする昇圧物質に拮抗するといわれている⁽³¹⁾。妊娠時における変化については少数の報告をみるのみ⁽²⁹⁾で、その動態については明確ではなく血中キノーゲン、尿中カリクレインの増加が報告されていることからKl-Kn系の亢進を推測できるととまる^(19),23),27),30)。

北川⁽¹⁰⁾は妊娠ラット肝でのAG mRNA, KG mRNAの産生亢進を認めており、正常妊娠においてはRn-An系, Kl-Kn系ともに基質レベルにおいても高産生域での血圧調節にあたっているものと推察している。

今回の著者らの実験結果からも、妊娠末期WKYにおけるAG mRNA産生は非妊時の1.87倍、KG mRNAも非妊時の1.68倍とほぼ同程度の増加をみることができ、妊娠時の肝での蛋白合成の亢進(単位重量あたりの総細胞質RNA量の1.53倍の有意の増加)を考え合わせると⁽¹⁴⁾、単位RNA量あたりのAG mRNA, KG

mRNA産生の亢進に留らず、全体のAG, KG産生の増加はこれを上まわるものと考えられ、妊娠時母体血圧維持におけるこれら液性調節因子の意義が重視される。

すなわち、妊娠個体ではAGとKGは両者の産生がほぼ均衡を保って増加し、循環動態の亢進にもかかわらずtail cuff法により測定した妊娠経過に伴う収縮期血圧の変動は正常域に維持されると考えられる。

SHRはWKYから高血圧個体の選択交配によって作られた高血圧発症動物であり、ヒトにおける本能性高血圧の動物モデルとみなされている⁽²⁰⁾。淵⁽⁵⁾は、妊娠SHRにおいて有意に子宮内胎児発育遅延(IUGR)の発生率が高く、さらに妊娠時の1.5%食塩水投与によっては非投与時の妊娠末期に見られる母獣の血圧低下が認められず、IUGRも一層高率に発生することから、これが混合妊娠中毒症モデルとして使用しうることを報告している。この際のIUGRの発生原因として、ヒト妊娠中毒症の病態と類似した子宮胎盤血管の攣縮による胎盤血流量の減少が考えられており、妊娠SHRに食塩負荷のもとでの妊娠末期の高血圧持続状態も混合型妊娠中毒症に類似している。よって今回、妊娠SHRとくにこれに食塩負荷を行ったものを用いて、妊娠高血圧に果たすRn-An系ならびにKl-Kn系の役割につき検討した。

その結果、SHRでは、WKYの妊娠時と異なるAG, KGの産生の様相を窺うことができた。非妊時SHRではAG mRNA, KG mRNAのMSCは非妊時WKYより有意に低値であり、高血圧の持続に伴う二次性的変化と思え、同時にKG産生の低値は高血圧発症に関与しているものと思える。Praddaudeら⁽²⁵⁾もWKYと比し尿中カリクレイン排泄量、腎皮質のカリクレイン量とも有意に低値であると報告しており、非妊時SHRにおいてKl-Kn系は低レベル状態にあると思われる。しかし、食塩負荷を行わない妊娠末期SHRでのAG mRNA, KG mRNAのMSCはともにそれぞれ非妊時の50%、177%の増加を示し、妊娠に伴う両基質産生の増加を認めることができ、とくにKG mRNAは1.77とほぼ妊娠末期WKYの1.87に匹敵する増加を示した。妊娠時WKYに比較するとAG mRNAのMSC値は1.44と妊娠末期WKYの3.36の43%にすぎないが、KG産生はWKYと同レベルに達するほどの産生亢進を示し、妊娠時SHRの液性調節機構の基質産生抑制の状況の中にあつて血圧調節機構がなお降圧系優勢に保たれていることが示唆される。妊娠の進行とともに、SHRでは収縮期血圧は有意に上昇して妊娠第16日にpeakを示すが、妊娠第18日以後は下降に転じ、第19日には平均143mmHgと著明な低下をみて非妊時の血圧を下まわる値を示す。この妊娠末期SHRにみられる血圧低下の機

序について、妊娠末期には AG mRNA の MSC 1.44 に対し KG mRNA の MSC は 1.77 と著しい上昇を示し、K1-Kn 系優位の亢進が生じるために、本態性高血圧合併妊婦でも観察されるのと相似した血圧の下降現象が妊娠末期 SHR に起こることが考えられる。この時期が妊娠動物での血中エストロゲン値の上昇期に一致していることは、妊娠時特有の系統血管拡張作用がエストロゲンの K1-Kn 系の亢進作用による可能性が示唆された。

次に妊娠 WKY への食塩負荷時の AG, KG 産生をみると、妊娠初期に一過性の血圧上昇をみるものの AG mRNA は 1.50 と非負荷時の約 2 分の 1 にまで著明に減少、一方 KG mRNA は 3.19 と非負荷群の 1.87 に比し著しい増加が生じている。食塩負荷時における Rn-An 系のレベルの低減は腎 *juncta glomerular cell* よりのレニン産生抑制を中心とする *feed back* 機構と考えられ、血中レニン活性の低下も妊婦や妊娠動物で観察されることが^{10,11)}、今回の実験では肝臓でのレニン基質の産生にもこの *feed back* 機構が及ぶことが明らかとなった。一方、これとは反対に KG の産生亢進が生じることは興味深く、食塩負荷に伴って発生する血圧上昇に拮抗する合目的性を持った変動と理解することができるが、その機序については今後の検討を要する点である。結果的に、妊娠 WKY においては全妊娠期間を通じてほぼ非妊時の血圧を維持し、食塩水負荷によっても AG 産生の減少、KG 産生の著増による代償的な液性調節機構の変動によって正常血圧を維持していると思われる。

妊娠 SHR への食塩負荷時による AG, KG の産生状況は、妊娠 WKY への負荷時とは著しい差異が認められ、妊娠 WKY 食塩負荷群でみられた AG 産生の明らかな低下、また KG 産生の著しい亢進などの食塩負荷による昇圧作用に拮抗する活発な代償反応は認められず、非負荷時の場合とほぼ同様の反応にとどまる。すなわち、妊娠末期に AG の軽度の産生亢進をみるにとどまった SHR は、食塩負荷群にあっても MSC 1.48 と非負荷群の 1.44 に比しほとんど変動を示さず、食塩負荷に対する産生低下という *feed back* 機構が作用することなく、SHR における AG 産生調節機構の障害を窺知しうる。実際、本山ら²¹⁾は正常妊婦ならびに妊娠中毒症妊婦の血漿レニン活性 (PRA) を測定したところ、妊娠中毒症例における PRA 値は正常妊娠例の値と比較して低値を示し、5% 食塩水負荷により正常妊婦とは逆に上昇傾向をしめすと報告しており、著者の動物モデルでのレニン基質産生の所見と極めて類似している。

KG 産生についても食塩負荷妊娠 SHR の MSC は 1.94 と非負荷時の妊娠末期 SHR の MSC 1.77 に比しほとんど変わらず、食塩負荷妊娠 WKY の 3.19 という著

明な産生増加には及ばず、食塩負荷によって発現するべき代償機能の限度が著しく制限されていることが推察される。SHR 食塩負荷群では妊娠 18 日以後に軽度の血圧低下傾向を示すものの、非負荷時にみられる正常血圧への復帰はなく妊娠末期にも高血圧状態が維持され、前記のごとき KG 産生障害が食塩負荷妊娠末期 SHR の高血圧維持に関与する要因の一つと考えることができる。Matsuura ら²⁰⁾は、妊娠末期ヒツジで A II に対する昇圧反応は鈍化するが、5% 高張食塩水を静脈投与するとこの昇圧不応性は失われ、非妊時と同程度の高い A II 反応性を示すにいたることをみている。このような食塩負荷による昇圧反応性の亢進には、血管壁に発生する浮腫による血管抵抗性の増大や、血管平滑筋細胞の Na-Ca ポンプの障害などの要因を介することも考えられているが、今回の研究結果からは AG, KG の代償的産生能の障害にその原因を求めることができ、混合型妊娠中毒症の背景としてもこのような液性調節機構の異常とくに降圧系の代償的障害が推測された。

ところで肝での AG mRNA 産生は、グルココルチコイド、アルドステロン、性ステロイド、甲状腺ホルモン (T₃) などにより複雑な調節を受けることが知られている^{21,12)}。ヒト妊娠時には胎盤で大量のエストロゲン (E) ならびにプロゲステロン (P) が産生され、母体血中レベルでの著明な上昇をみる。実際に肝環流実験でのサイロキシン、エストロゲンによる肝レニン基質産生の亢進²²⁾、E₂, P の上昇による血漿レニン活性を亢進²⁰⁾、去勢雌動物へのエストラジオール (E₂) 負荷による肝 AG 産生増加¹⁸⁾が報告されており、今回の実験結果とあわせて妊娠時の Rn-An 系亢進の成因として血中エストロゲンおよびプロゲステロンレベルの上昇に伴う肝での基質産生亢進が主たる要因として考えられる。しかし KG の産生調節と性ステロイドの関連について検討した報告はみられない。齧歯類羊蹄動物では血中エストロゲンレベルは妊娠末期に急増することが知られ²³⁾、SHR での血圧下降がほぼこの時期に一致して起こることから、エストロゲンの肝 KG 産生への密接な関連が推察される。今回、去勢成熟雌ラットに E₂ 単独、P 単独、また E₂ と P を同時に投与した場合の AG, KG 産生につき検討を加えた。去勢により肝での AG, KG mRNA の MSC はそれぞれ 0.29, 0.35 と対象の 1.80, 0.95 と比し著しく低値となり、E₂ の投与により AG, KG 産生はそれぞれ亢進傾向を示す。肝細胞の性ステロイドレセプターの存在は知られていることから、この亢進については肝細胞での E₂ レセプターを介する mRNA 合成促進によるものと思われる。次にプロゲステロン単独投与では、AG 産生には有意の増加をみないが、KG 産生は有

意に増加し、KG に対しては産生を促進することが判明した。さらに E₂ と P の同時投与では AG に対しては E₂ 単独投与とほぼ同程度の増加傾向を示したにすぎないが、KG に対しては MSC 2.18 と去勢時の 6.2 倍に達する著しい増加を示した。このように P は KG に対しては E₂ と同様の産生促進作用を持ち、さらに E₂ との同時投与では相乗的産生促進作用を示した。一般に性ステロイド作用の特性として、E₂ 作用による P レセプターの増生が知られているが、KG 産生の相乗的増加に関してはこのようなレセプター増生を介する機序が推想され、今後の検討を要する。妊娠末期 WKY の肝 AG、KG の産生が対照のそれぞれ 86.7%、64.0% 増となるのは、妊娠末期の血中 E、P レベルの上昇に呼応した結果と考えることができる。今回の去勢 WKY を用いた性ステロイド負荷実験から直ちに妊娠中毒症モデルでの AG、KG 産生障害に関連を求めることは困難であったが、妊娠中毒症患者の胎盤機能不全による性ステロイド産生低下も血圧上昇に対する代償液性調節機構障害の病態を推定せしめ、今後検討をされるべき点である。

以上のごとく、正常血圧動物および自然発症高血圧妊娠動物での妊娠経過に伴う肝 AG、KG 産生の変動、ならびに食塩負荷に伴う AG、KG 産生の反応性的変化を検討した。正常血圧動物妊娠時には性ステロイドの増加に伴う AG、KG 産生亢進により高レベルの状態で正常血圧維持のために調節機能を発揮するが、一方妊娠 SHR においては妊娠に伴う AG、KG 産生は KG 優位の亢進がみられ妊娠後期血圧の低下を示すが、食塩負荷時には WKY にみられる AG 産生の減少、KG 産生の増加という顕著な代償産生変化はみられず、全妊娠期間を通じ高血圧を維持する結果をまねく。すなわち、混合妊娠中毒症のモデルとみなされる食塩負荷妊娠 SHR は、AG および KG の代償的産生機構の障害にもとずく血圧調節機能の異常をもたらし、妊娠高血圧の病態形成に関わることが推測された。

(結 論)

妊娠中毒症の病態形成に関わる Rn-An 系、Kl-Kn 系の意義を明らかにするため、正常血圧ラット (WKY) および自然発症高血圧ラット (SHR) の妊娠経過に伴う肝 AG mRNA、KG mRNA 発現の変化と、食塩水負荷時のこれらの変動につき検討した。さらに変動の要因として性ステロイドの効果をみるため去勢雌 WKY への性ステロイド負荷実験を行い以下の結果を得た。

1) 妊娠末期 WKY では非妊時と比し肝 AG、KG mRNA それぞれ 87%、68% の発現の増加を認め正常血圧を維持した。食塩負荷時においては非負荷時に比し

AG の 53% の減少に対し KG は 71% 増加と代償的な産生の変動がみられ、正常血圧を維持した。

2) 妊娠末期 SHR では非妊時に比し AG mRNA は 50% の増加にとどまるのに対し KG mRNA は 177% と産生が優位となり、高血圧状態は妊娠末期に正常血圧に復する。しかし、食塩負荷時においては非妊時に比し、それぞれ 54%、203% の増加と食塩非負荷妊娠時とほぼ同程度の増加にとどまり、食塩負荷時 WKY にみられた代償性的液性血圧調節機構の作動はみられず妊娠末期においても高血圧を維持した。

3) 去勢雌 WKY への E₂ または P の負荷により AG 産生はともに増加傾向を示し、KG 産生は去勢時と比しそれぞれ 154%、129% 増加、とくに E₂、P の同時投与により 523% 増と著増を示した。妊娠時の性ステロイド増加が、妊娠個体特有の血圧調節に関与することが推想された。

以上より、食塩負荷妊娠 SHR は混合妊娠中毒症に類似した妊娠高血圧を生じ、この際の AG および KG の産生障害にもとずく液性血圧調節機構の異常が妊娠高血圧の病態形成に関与することが推測され、その背景には妊娠時に主として胎盤で産生される性ステロイドの影響があることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲賜りました愛媛大学医学部産科婦人科学教室松浦俊平教授に深謝いたします。また、実験に関し終始適切なる御助言をいただきました愛媛大学医学部産科婦人科学教室北川博之講師に深謝いたします。

(引 用 文 献)

1. Broughton PF, Hunter JC, Turner SR: Prostaglandin E₂ attenuates the pressor response to angiotensin II in pregnant, but non-pregnant humans. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142: 168-172.
2. Chang E, Perlman AJ: Multiple hormones regulate angiotensinogen messenger ribonucleic acid levels in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology* 1987; 121: 513-519.
3. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299.
4. Fowler WL, Johnson JA, Kurz KD, Payne CG: Role of the renin-angiotensin system in

- maintaining arterial pressure in conscious pregnant rats. *Endocrinology* 1981; 109: 290-295.
5. 淵 勲: 妊娠高血圧とIUGRに関する基礎的研究, 周産期シンポジウム No. 7 1989: 12-21.
 6. 古橋信晃: 内分泌動態よりみた妊婦の血圧調節と病態生理. 友田豊, 佐藤和男編, 妊娠時の血圧調節機構と病態生理 メディカルトリビューン社 1989: 35-44.
 7. Fruto-Kato S, Matsumoto A, Kitamura N, Nakanishi S: Primary structure of the mRNAs encoding the rat precursors for bradykinin and T-kinin. *J Biol Chem* 1985; 260: 12054-12059.
 8. Gray WGN, Biswas EE, Bashirelahi N, Biswas SB: A low-affinity estrogen-binding site in pregnant rat uteri: Analysis and partial purification. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 11502-11506.
 9. 平松祐司, 米沢優, 江口勝人: 妊娠中毒症におけるレニン, アンギオテンシン, アルドステロン系およびカリクレイン, キニン系の検討. 産婦人科の世界 1984; 36: 180-183.
 10. Iwao H, Fukui K, Kim S, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, Abe Y: Sodium balance effects on renin, angiotensinogen, and atrial natriuretic polypeptide mRNA levels. *Am J Physiol* 1988; 255: E129-136.
 11. 岩尾洋, 安部陽一: レニン・アンギオテンシン系の遺伝子発現 日薬理誌 1991; 97: 1-11.
 12. Kalinyak JE, Perman AJ: Tissue-specific regulation of angiotensinogen mRNA accumulation by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987; 262: 460-464.
 13. Kelli N, Susan K: Effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on pressor responsiveness to angiotensin II. *Am J Physiol* 1991; 261: R1164-1170.
 14. 北川博之: 妊娠ラットにおけるアンギオテンシノーゲン, キニンノーゲン, プレプロ心房性ナトリウム利尿ポリペプチドのmRNAレベルでの発現に関する研究. 媛医 1987; 6: 48-57.
 15. Kitagawa H, Kitamura N, Hayashida H, Miyata T, Nakanishi S: Differing expression patterns and evolution of the rat kininogen gene family. *J Biol Chem* 1987; 262(5): 2190-2198.
 16. Larry C, Gilstrap III, Norman FG: Pathophysiology of preeclampsia. *Seminars in perinatology* 1990; 14: 147-151.
 17. Lye SJ, Nicholson BJ, Mascarenhas M, Mackenzie L, Petrocelli T: Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen: progesterone ratio. *Endocrinology* 1993; 132: 2380-2386.
 18. Lynch KR, Peach MJ: Molecular biology of angiotensinogen. *Hypertension* 1991; 17: 263-269.
 19. Marcel GA, Casper C, Sabatier C: High prekallikrein levels during pregnancy. *Pathol Biol* 1975; 23: 66-71.
 20. Matsuura S, Naden RP, Grant NF, Parker CR, Rosenfeld CR: Effect of hypertonic saline on vascular responses to angiotensin II in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 231-240.
 21. 本山覚, 望月真人, 東条伸平: 妊娠時のレニンとアルドステロン. 日産婦誌 1980; 32: 1977-1985.
 22. Murakami E, Hiwada K, Kokubu T: Effects of angiotensin II; Thyroxine and estrogen on plasma renin substrate production by the liver. *Jpn Circul J* 1981; 45: 1078-1082.
 23. 武藤伸二郎, アンソン. テー, 下地祥隆: 正常妊娠, 分娩, 産褥期における尿中FPA, B β 15-42, カリクレイン, キニナーゼの動態に関する研究. 血管と脈管1988; 19: 68-76.
 24. 奈良安雄, 家森幸男: 遺伝性自然発症高血圧ラット(SHR), 医学のあゆみ 1991; 159: 336-339.
 25. Praddaude F, Tran-Van T, Ader JL: Renal kallikrein activity in rats developing spontaneous hypertension. *Clin Sci* 1989; 76: 311-315.
 26. Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labeling Deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1977; 113: 237-251.
 27. 斉藤勝, 羽田義信, 棟方哲: 産科領域における尿kallilreinの臨床意義. 日産婦誌 1986; 38: 187-194.
 28. Sealey JE, Itskovitz-Eldor J, Rubattu S, James

- GD, August P, Thaler I, Levron J, Laragh JH: Estradiol- and progesterone- related increases in the renin- aldosterone system: Studies during ovarian stimulation and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 ;79 (1): 258-264.
29. Seino M, Carretero OA, Albertin R: Kinins in regulation of utero -placental blood flow in the pregnant rabbit. *Am J Physiol* 1982; **242**: 142.
30. 曾我賢次：産科，婦人科における血漿プレカリクレインの生理と病理。日産婦誌 1982；**34**：1763-1772.
31. Whorton AR, Young SL, Data JL: Mechanism of bradykinin stimulated prostacyclin synthesis in porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys acta* 1982; **712**: 79-87.
32. Wilson M, Morganti AA, Zorvoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Oeyon PV: Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Amer J Med* 1980; **68**: 97-104.
33. 山崎峰夫，森川肇，望月真人：妊娠高血圧症の病態解析に関する研究— angiotensi II ならびに食塩負荷時の昇圧系，降圧系の内分泌動態の検討，日産婦誌 1985；**37**：2315-2324.