

内因性ジギタリス様物質と高血圧

島本和明

1. はじめに

Na^+ , K^+ -ATPase は動物細胞膜に普遍的に存在する酵素であり, Na ポンプとして働くことにより細胞内外の Na^+ , K^+ 濃度勾配の維持など細胞機能にとり基本的な役割を果たしている. Na^+ , K^+ -ATPase の構成要素である α 鎖の細胞膜外側にはジギタリスなどの強心配糖体に対する特異的かつ高親和性の結合部位が備わっている. この受容体に結合し, Na^+ , K^+ -ATPase 活性を抑制的に調節していると考えられている生体内物質が EDLF である.

食塩あるいは鉍質コルチコイドを長期投与した際, 一時的に体液, Na 貯留が派生するが, 4~6日 で Na 利尿を生じ, いわゆるエスケープ現象により体液貯留は是正される. その機序は, Na 排泄に関わる GFR・アルドステロンの第一, 第二因子のみでは説明できないため第三の Na 利尿因子が存在する可能性が古くより示唆されてきた. そして, その候補物質として, プロスタグランジン・カリクレイン・キニン系, ANF, CGRP など多くの脈管作動物質が挙げられてきたが, いずれも単独では第三因子足りえず, 更に未知の Na 利尿因子として EDLS が探索されてきた. 一方, 本物質の研究は高血圧の成因の面からも行われてきている. すなわち, 食塩の過剰摂取が高血圧の発症・維持に関与している可能性については, 実験, 臨床の両面および疫学面から多くの研究がなされてきたが, その機序については不明な点が少なくない. 本態性高血圧症で, 食塩を過剰摂取した際の昇圧機序としては, 従来, 循環血液量の増大が重視されてきたが, 最近, 食塩負荷による内因

性血管収縮物質の増加による可能性が示されており, この体液性因子の一つとして内因性ジギタリス様物質 (EDLS) の役割が指摘されている. ことさら, 低レニン本態性高血圧症では体液貯留のみならず末梢血管抵抗の増大も著しいとされるが, この群の交感神経系, renin-angiotensin 系活性はむしろ抑制されており, 末梢血管抵抗増大に基づく昇圧機転には明確な説明がなされていない. この点に関して最近, 体液量・体内 Na 量の増大が EDLS の活性を亢進させて末梢血管抵抗を増大させ, 高血圧を発症させるとの仮説が注目されるようになった.

しかしながら, 本物質は未だ化学的に十分同定されておらず, 少なくとも現時点においてはその実態は不明であるといわざるを得ない. そこで本稿では EDLS の精製に関する問題点も含め, 高血圧と本物質との関連について概説したい.

2. 歴史的背景

1961年 de Wardener ら¹⁾は, イヌを用いた腎臓の交叉灌流実験により, 糸球体濾過量や腎血流量が減少した状態においても生理食塩水を負荷すると Na 利尿をきたすことを証明し, 糸球体濾過量, アルドステロンにつぐ Na 利尿因子として第三因子を推測した. 1969年 Dahl²⁾は食塩負荷により高血圧をきたす Dahl-S ラットと血圧上昇をきたさない Dahl-R ラットとを parabiosis により結合することによって, Dahl-R ラットに高血圧を発症させることができ, 同時に Na 排泄の増加を観察した. そこで彼は, Na 負荷により血中に増加する Na 利尿因子が同時に血管に作用して血圧を上昇させるという仮説を唱えた. 1975年, Michalakis ら³⁾は, 片腎摘犬に高血圧者や実験的高血圧動物の血漿を少量静脈内投与すると, 外因性ノル

エピネフリンおよびアンジオテンシンⅡに対する血管反応性が増強することを認め、これらの高血圧動物にはノルエピネフリンやアンジオテンシンⅡに対する昇圧反応の増強因子が存在することを示した。翌年、Haddy および Overbeck⁴⁾は、容量依存型高血圧動物の血管壁では、ouabain-sensitive な⁸⁶Rb 取り込み機構が障害されており、血管壁 Na⁺-K⁺ ATPase 活性が低下している可能性を指摘した。1977年には、Gonick⁵⁾らにより初めて容量負荷ラットの血漿中に腎 Na⁺-K⁺ ATPase を阻害する因子の存在が証明されて以来、Na 利尿因子が Na⁺-K⁺ ATPase 阻害物質であることを示唆する数多くの成績が報告されている。

1979年には、Flier ら⁶⁾により Toad Bufomarinus の血漿中にジゴキシン抗体と交叉反応し、Na⁺-K⁺ ATPase を阻害する因子の存在が指摘され、翌年 Gruber ら⁷⁾は、容量負荷を受けた犬血漿中にジゴキシン抗体と交叉反応する低分子量の物質の存在を報告した。一方、強心配糖体であるジギタリスは、Na⁺-K⁺ ATPase の特異的な抑制剤として知られており、薬理的にも Na⁺-K⁺ ATPase と結合してその作用を抑制し、さらに免疫学的にもジギタリスに類似している可能性が示されたことから、この因子が内因性ジギタリス様物質と呼ばれるようになった。その本体は、尚不明であるが、本体解明にむけて鋭意検討がすすめられている。

3. EDLS の本体に関する最近の研究

Bidard ら⁸⁾ (1985年) は、EDLS が不飽和脂肪酸類似物質であることを初めて報告した。その後、Tamura ら⁹⁾は、急性食塩負荷後のブタ血漿から EDLS を抽出・同定し、オレイン酸およびリノレン酸の長鎖不飽和脂肪酸であると報告した。しかしながら、両物質とも Na⁺-K⁺ ATPase に対して親和性が低く、Lichtstein ら¹⁰⁾は、これらは特異性も低いことを報告している。Kelly ら¹¹⁾は、EDLS が長鎖非エステル脂肪酸およびライソリン脂質である可能性を示し、Hamlyn ら¹²⁾も本態性高血圧患者から lysophosphatidylcholine などと同定したが、後にこれらの物質は非特異的 Na⁺-K⁺ ATPase 阻害物質であることが判明している。

Gruber ら⁷⁾ (1980年) は、ペプチドである可能性を初めて報告した。Kramer ら¹³⁾は、食塩負

荷された健康人の尿から EDLS が低分子量、弱酸のペプチドであることを示し、Morgan ら¹⁴⁾は、ラット視床下部培養細胞から熱に安定な EDLS 性質を有するペプチドを部分精製しているが、このようなペプチド説も否定的となっている。

Cloix ら¹⁵⁾ (1985年) は、ヒトの尿から分子量 431 のアミノグリコステロイドを精製・同定したと報告、翌年、Lichtstein ら¹⁶⁾は、カエルの皮膚、血漿から構造式が resibufogenin である EDLS を同定したが、哺乳類で同物質が EDLS である可能性は証明されていない。このように EDLS の研究の流れの中で、多くの既知物質がその候補として報告されたが、いずれも特異性、高親和性、可逆性など EDLS の満たすべき条件を考慮すると否定的であった。

1990年にいたり、Hamlyn らのグループ¹⁷⁾はヒト血漿300Lより EDLS の完全精製品31 μ gの単離に成功した。得られた EDLS は、化学、生化学、生物学、免疫学各面からの分析の結果、植物由来強心配糖体 ouabain そのものあるいはその isomer と結論され、ouabain-like compound (OLC) と命名された。現時点ではこの OLC がもっとも確からしい EDLS であるの意見が強いが、その糖鎖が ouabain と同じラムノースであるかどうかは未解決である。OLC についての一番の問題点はその由来であり、内因性物質である証明には食物からの混入の除外とともに生体内合成経路の確定が必要である。ヒトを含む哺乳類における血漿中 OLC 濃度は80~138pMであり、ミネラルコルチコイド高血圧ラットでは9倍の高値を示したという。又、Hamlyn らは、ウワバインを長期に投与するとラットで高血圧を発生するが、ジゴキシンでは血圧が上昇せず、むしろウワバインの昇圧を抑制するとの成績を発表しており、昇圧に關与する EDLS はジゴキシンはなく、ウワバインのみであると述べている。

4. EDLS の測定法

EDLS の測定には、現在のところ次の4方法があり、これらの方法を利用して EDLS の検出がなされている。

- (1) Na⁺-K⁺ ATPase 酵素活性の測定として、基質 ATP あるいは ATP 加水分解産物の ADP や無機リンを測定する (Hamlyn の方法)。

- (2) 細胞の Na/K 輸送の検討として, intact cell での Na, K の動きをそれぞれ ^{22}Na 流出, ^{86}Rb 流入により評価する.
- (3) Intact cell あるいは膜分画を用いて, ^3H 標準ウアバインの結合を測定する (radioreceptor assay).
- (4) ジゴキシンあるいはウバインに対する抗体との免疫学的交叉反応を検討する (radioimmunoassay).

これらの方法に基づく EDLS は, 容量負荷時に血中・尿中で増加することが示され, さらに高血圧動物では対照動物より高値を呈することが証明されてきた. しかしながら研究の進展にともない, おのおのの検出法が必ずしも同一物質を同定していない可能性も指摘されている. イヌ腎 Na^+-K^+ ATPase などを用いて阻害度を検討する方法では, K イオンなどの非特異的物質による Na^+-K^+ ATPase 活性に対する影響も考慮して測定がなされねばならない. Intact cell を用いての Na^+-K^+ ATPase 活性の測定においては, インキュベーション時間が重要であり, 長時間の場合は EDLS が洗い流された状態で測定している可能性もある. 一方, ウバインやジゴキシン抗体との交叉反応に関しては, ステロイドなどの非特異的な物質との反応による偽陽性も考えられるので, EDLS の検出に関しては慎重を要する.

いずれにしても, EDLS の本体が明らかになれば, 測定法に関しては解決をみる事になり本体に関する今後の検討が待たれる.

5. EDLS の生理作用

EDLS は Na 利尿作用と血管収縮作用 (昇圧作用) を併せもつものと考えられている. EDLS の産生部位は視床下部にある諸核とする報告が多く, とくにラットでは第三脳室前下部の AV3V 領域が注目されている. EDLS は髄液中の Na の上昇により遊出するとの報告が多いが, まだ結論は得られていない. Blaustein ら¹⁸⁾ は, EDLS は腎尿細管の basolateral membrane に存在する Na^+-K^+ ATPase に作用して尿中 Na 再吸収を抑制し, Na 排泄量を増加させ体内 Na 量を調節するとともに, 血管平滑筋細胞, 交感神経末端, 血球の Na^+-K^+ ポンプにも作用を及ぼすと考えている. 一般に心筋や血管平滑筋の収縮反応あるいは各種神経伝

達物質の遊離には, 細胞外から内への Ca 流入, 細胞内 Ca 濃度の上昇が必要である. 血管平滑筋細胞内 Ca 濃度は 10^{-7}M であるのに対し, 細胞外 Ca 濃度は 10^{-3}M との細胞膜を介して約 1 万倍もの差がある. 血管平滑筋収縮のためには, この細胞内遊離 Ca channel を介して細胞外および細胞内 Ca 貯留器官よりの細胞質内への Ca イオンの移動により細胞質内遊離 Ca 濃度の上昇がもたらされる. Ca 流入の経路として, 膜電位依存性 channel の 2 つが主に考えられており, 一方, 細胞内 Ca 濃度を細胞外より低く保つ機構としては, Ca^{++} -ATPase による Ca^{++} ポンプと $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 交換機構がある. この $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 交換機構を抑制するものは, 細胞内外の Na 勾配であり, 細胞内 Na の増加は細胞内 Ca の増加を引き起こす. したがって, EDLS による Na ポンプの持続的抑制は細胞内 Na 貯留を引き起こし, Ca 濃度の上昇をもたらす可能性がある. 一方, EDLS により Na^+-K^+ ATPase が抑制されると膜電位の脱分極が生じ, 膜電位依存性 Ca channel を介して細胞内への Ca 流入が高まるとの説もある. いずれの説でも血管平滑筋細胞内 Ca の上昇を介して細胞の tone が亢進するとともに, ノルエピネフリンやアンジオテンシン II に対する反応性も増強すると考えられる. さらに Blaustein は, この EDLS が交感神経末端の Na^+-K^+ ATPase に作用すると神経末端内の Na 増加を引き起こし, 神経末端からの NE の放出を促進するとともにその再摂取を抑制する可能性が十分考えられ, このことが血圧を上昇させる一因である可能性も指摘している.

6. EDLS と本態性高血圧症

Poston ら¹⁹⁾ は, EDLS は本態性高血圧患者で正常血圧者に比し有意に高値であり, 血圧と正相関し, 血漿レニン活性と逆相関することを示した. 彼らのグループは, 食塩負荷したヒトでは減塩時より DLS は 20 倍高値を呈すると報告している²⁰⁾. 一方, Blaustein ら¹⁸⁾ は, ウサギ大動脈の strip を本態性高血圧患者の血漿で incubate した場合に, 正常血圧者の血漿に比し外因性ノルエピネフリンに対する収縮反応は増強することを示した. 我々も, 特に低レニン本態性高血圧患者では, 腎の Na 排泄低下に伴う EDLS の増加が成因論的に大

きな意義を有する可能性²¹⁾を推測してきた。そして、腎 Na 排泄障害のモデルとして段階的腎摘ラットを作製して検討した結果、ことさら5/6腎摘ラットで、EDLS の増加が昇圧機転と高血圧の維持に重要な役割を果たしている所見が見出された^{22,23,24)}。de Wardener ら²⁵⁾は、本態性高血圧症では遺伝的に腎の Na 排泄障害が存在し、一日の食塩摂取が60mEq 異常あると体内に Na 貯留をきたす可能性があるとの仮説を提唱している。このように腎での Na 排泄能が何らかの理由により低下していると、初期には Na 貯留により循環血液量の増大がみられるが、後にこの Na 貯留が刺激となり血中 EDLS の増加をもたらし、その Na 利尿作用により循環血液量が正常化するとともに、EDLS の心・血管系および神経系への作用により血圧が上昇すると考えられる (図 1)。このような EDLS 仮説が本態性高血圧症の成因として重要な位置を含めつつあり、今後の解明が待たれる。

7. おわりに

内因性ジギタリス様物質 (EDLS) の本体、測定法、高血圧との関連に関する最近の知見について述べた。EDLS がウワバインのみでよいのか、他の物質もありうるのかを含め、本研究領域では、その本体の同定が最も重要であり今後の解明が望まれる。

腎における Na⁺排泄能の遺伝的な低下が存在すると、Na の摂取が増した場合、体内の Na 貯留は一層著しくなり、細胞外液量が増加して視床下部からの Na⁺-K⁺-ATPase 阻害物質 (ジギタリス様物質) の放出を刺激する。その結果、Na⁺-K⁺ 輸送が阻害され、腎での Na 排泄は促進されるが、血管平滑筋においては細胞内 Na⁺、Ca²⁺ の貯留が生じ、血管抵抗が増加して血圧上昇をきたすというものである。

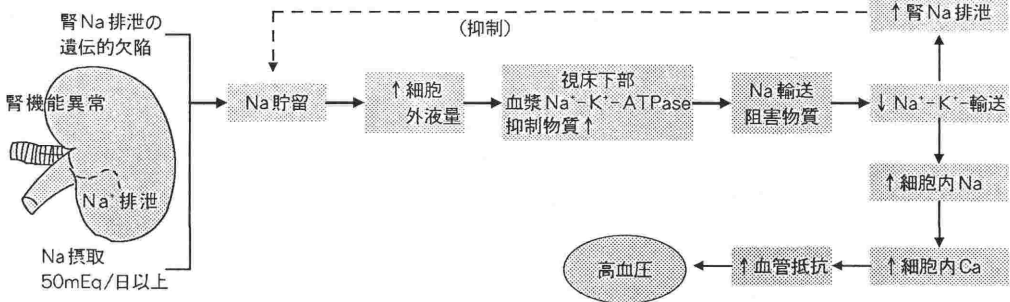


図 1 EDLS 説による血圧上昇の機序 (文献25より引用, 改変)

文 献

- 1) de Wardener HE, Mills H, Clapham WF : Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. Clin Sci 21 : 249~258, 1961
- 2) Dahl LK, Knudson DKD, Iwai J : Hormonal transmission of hypertension : Evidence from hypertension. Circ Res 24 25(suppl. I) : 21~33, 1969
- 3) Michelakis AM, Mizukoshi H, Huang C, et al : Further studies on the existence of a sensitizing factor to pressor agents in hypertension. J Clin Endocrinol Metab 41 : 90~96, 1975
- 4) Haddy FJ, Overbeck HW : The role of humoral agents in volume expanded hypertension. Life Sci 19 : 935~948, 1976
- 5) Gonick HC, Kramer HJ, Paul W, et al : Circulating inhibitor of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase after expansion of extracellular fluid volume in rats. Clin Sci Mol Med 53 : 247~255, 1977
- 6) Flier JS, Maratos-Flier E, Pallotta JA, et al : Endogenous digitalis-like activity in the plasma of the toad Bufomarinus. Nature 279 : 341~343, 1979
- 7) Gruber KA, Whitaker JM, Buckalew VM : Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume expanded dogs. Nature 287 : 743~745, 1980
- 8) Bidard JN, Rossi B, Renaud JF, et al : A search for an ouabain-like substance from the electrophorus electricus which led to arachidonic acid and related fatty acids. Biochim Biophys Acta 769 : 245~252, 1985
- 9) Tamura M, Kuwano H, Kinoshita T, et al : Identification of linoleic and oleic acids as endogenous Na, K-ATPase inhibitors from acute volume-expanded dog plasma. J Biol Chem 260 : 9672~9677, 1985

- 10) Lichtstein D, Samuelov S, Deutsch J, et al : The ouabain receptor in animal tissues and its endogenous ligand. *Klin Wochenschr* 65 (suppl. VIII) : 40~48, 1987
- 11) Kelly RA, O'Hara D, Mitch WE, et al : Identification of Na, K-ATPase inhibitors in human plasma as nonesterified fatty acid and lysophospholipids. *J Biol Chem* 261 : 11704~11711, 1986
- 12) Hamlyn JM, Schenden JA, Zyren J, et al : Purification and characterization of digitalis like factors from human plasma. *Hypertension* 10 (suppl. I) : 71~77, 1988
- 13) Kramer HJ, Heppe M, Weiler E, et al : Further characterization of the endogenous natriuretic and digoxin-like immunoreacting activities in human urine : effects of changes in sodium intake. *Renal Physiol* 8 : 80~89, 1985
- 14) Morgan K, Lewis MD, Spurlock G, et al : Characterization and partial purification of the sodium-potassium-ATPase inhibitor released from cultured rat hypothalamic cells. *J Biol Chem* 260 : 13595~13600, 1985
- 15) Cloix JF, Crabos M, Wainer IW, et al : High yield-purification of a urinary Na pump inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 131 : 1234~1240, 1985
- 16) Lichtstein D, Kachalsky S, Deutsch J : Identification of a ouabain-like compound in toad skin and plasma as a bufodienolide derivative. *Life Sci* 38 : 1261~1270, 1986
- 17) Hamlyn JM, et al : Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 6253, 1991
- 18) Blaustein MP, Hamlyn JM : Sodium transport inhibition, cell calcium and hypertension. The natriuretic hormone/Na⁺-Ca²⁺ exchange/hypertension hypothesis. *Am J Med* 77(4A) : 45~59, 1984
- 19) Poston L, Sewell RB, Wilkinson SP, et al : Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *Br Med J* 282 : 847~849, 1981
- 20) Fenton S, Clarkson EM, MacGregor GA, et al : An assay of the capacity of biological fluids to stimulate renal glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in vitro as a marker of their ability to inhibit sodium, potassium-dependent adenosine triphosphatase activity. *J Endocrinol* 94 : 99~110, 1982
- 21) Saitoh S, Shimamoto K, Nakagawa M, et al : The pathophysiological role of digitalis-like substance essential hypertension. *J Hypertens* 6 (Suppl 4) : S360~S362, 1988
- 22) Shimamoto K, Nakagawa H, Nakagawa M, et al : Endogenous digitalis-like substance and renal dopaminergic system in reduced renal mass hypertensive rat. In : Soares Da Silva P, editor. *Advances in the Biosciences. Cardiovascular and Renal Actions of Dopamine*. (Vol. 88) Oxford, Pergamon. Press, 1993, pp.165~174
- 23) 大本泰裕, 島本和明, 増田敦 : 段階的腎摘高血圧ラットの昇圧機転に関わる内因性 digitalis 様因子及び腎 prostaglandin 系の役割. *札幌医誌* 61 : 267~277, 1992
- 24) 中川英久, 島本和明, 中川基哉他 : 段階的腎摘ラットの高血压発症とその維持機構に関わる内因性 digitalis 様因子 (EDLF) の役割. *日内分泌会誌* 69 : 562~574, 1993
- 25) de Wardener HE, MacGregor GA : Dahl's hypothesis that a saluretic substance may be responsible for a sustained rise in arterial pressure : Its possible role in essential hypertension. *Kid. Int* 18 : 1~9, 1980