

原 著

高血圧ラットにおける β -aminopropionitrile の血圧と
血管壁コラーゲン生合成に対する影響

岩 月 和 彦
信州大学医学部薬理学教室

EFFECTS OF β -AMINOPROPIONITRILE ON BLOOD PRESSURE
AND COLLAGEN BIOSYNTHESIS IN BLOOD VESSELS
OF HYPERTENSIVE RATS

Kazuhiko IWATSUKI

Department of Pharmacology, Shinshu University School of Medicine

IWATSUKI, K. *Effects of β -aminopropionitrile on blood pressure and collagen biosynthesis in blood vessels of hypertensive rats.* Shinshu Med. J., 28: 229-234, 1980

The effect of β -aminopropionitrile on blood pressure and collagen biosynthesis in blood vessels was investigated in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. β -Aminopropionitrile, a specific inhibitor of lysyl oxidase, prevented the rise in blood pressure induced by DOCA-salt in rats. In addition, after the onset of hypertension, administration of β -aminopropionitrile lowered the blood pressure. Concomitant with the lowering of blood pressure, there was a reduction in the more highly cross-linked form of vascular collagen. These findings indicate that increases in vascular connective tissue are not only sequelae of hypertension, but may also contribute to the maintenance of elevated blood pressure.

(Received for publication; December 5, 1979)

Key words ; 高血圧ラット (hypertensive rat)
 β -aminopropionitrile
血圧 (blood pressure)
コラーゲン生合成 (collagen biosynthesis)

I 緒 言

コラーゲンが生体のタンパク質の約1/3という大きな比率を占めているため、生理的な多方面にわたる役割を見逃すことができない。従って病的な状態のさいには、そこに占めているコラーゲンも多彩な変化を示すことが考えられる。事実、高血圧時には、血管壁中の prolyl hydroxylase 活性の増大、proline の取り込みの増加や総コラーゲン量の増加など、血管壁中のコラーゲンの生合成が有意に増加している¹⁾³⁾。この増加したコラーゲン生合成は、降圧剤で血圧を低下させたときには、有意に抑制されている¹⁾²⁾。これらのことから、コラーゲンの血管壁への沈着は、高血圧の結果の一つとも考えられている¹⁾³⁾。

そこで本実験では、lysyl oxidase の選択的な抑制剤の β -aminopropionitrile (BAPN) を使って高血圧ラットのコラーゲン生合成や沈着を抑制した場合、血管壁中のコラーゲンの変化が、高血圧の発症や維持にどのような影響を与えるのかを観察し、高血圧時における血管壁コラーゲンの役割を検討した。

II 実験方法

エーテル麻酔下、11週令の雄、Wistar 系ラット(体重300~350g)の右側腎臓を摘出し、12週令より使用した。このラットを3群に分け、第1群に deoxycorticosterone acetate (DOCA) を5mg/ラット、週2回皮下投与⁴⁾、第2群にDOCA投与と同時に、50mg/kg 又は100mg/kg の β -aminopropionitrile (BAPN) を1日2回腹腔内投与、第3群は、BAPNのみを投与した。無処置正常血圧ラットを対照群とした。ラットは、固型飼料と食塩1%の飲料水で飼育された。週2回、血圧を無麻酔下で尾動脈より非観血的に測定した(Narco, PE300)。

経時的にラットを断頭により殺し、大動脈および腸間膜動脈を注意深く摘出した。各血管は、30倍の0.5Mの酢酸にてホモジナイズし、可溶性コラーゲンを4°Cにて、24時間抽出した⁵⁾。抽出液を11,500g、30分にて遠心分離し、上清を10mMの酢酸にて24時間透析。透析後、抽出上清液と遠心沈澱物(不溶性コラーゲンを含有)を凍結乾燥し、6M塩酸105°C、24時間加水分解を行った。加水分解後の塩酸溶液をKOHで中和し、hydroxyproline 量をKivirikkoら⁶⁾の方法を用いて測定し、血管壁中のコラーゲン含量を算出した。

ラット脳内中の norepinephrine, dopamine の測定は、Schlumpf ら⁷⁾の方法により行った。

本実験に使用した薬剤 deoxycorticosterone acetate (DOCA, ICN) は、トウモロコシ油に懸濁させ、 β -aminopropionitrile fumarate (BAPN, Aldrich) と iproniazid phosphate (Sigma) は0.9%の生理食塩水に溶解して用いた。またBAPNと iproniazid の用量は、free base で表した。統計的な処置は、paired t-test で行った。

III 結 果

A 血圧に対するBAPNの影響

Fig. 1 に示したように、ラットの血圧は、DOCA を処理することにより、2週目より上昇しはじめ、4週目では、200mmHg を越えた。BAPN100mg/kg投与群では、血圧の上昇が6週にわたって抑制されていた。BAPN50mg/kg 投与群では、血圧の上昇抑制が認められたがその作用は弱く、投与3週後から徐々に血圧が上昇しはじめ、6週後では、DOCA高血圧群と同じ血圧を示すようになった。

次に BAPN100mg/kgを長期に投与し、高血圧の

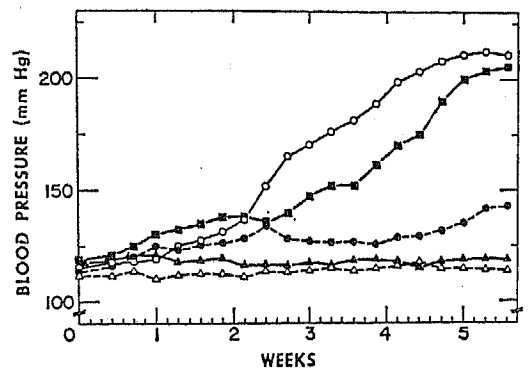


Fig. 1. Uninephrectomized male rats (12 weeks old) were given deoxycorticosterone acetate (5 mg/rat) twice weekly and maintained on saline (○). Concomitant with the deoxycorticosterone-salt treatment, β -aminopropionitrile (50 mg/kg, ■ and 100mg/kg, ●) was administered twice daily by intraperitoneal injection. Intact, normotensive rat (▲) and uninephrectomized normotensive rats given the high dose of β -aminopropionitrile (△) served as controls. Each point represents the mean of values for at least 10 rats.

BAPN の血圧とコラーゲンに対する影響

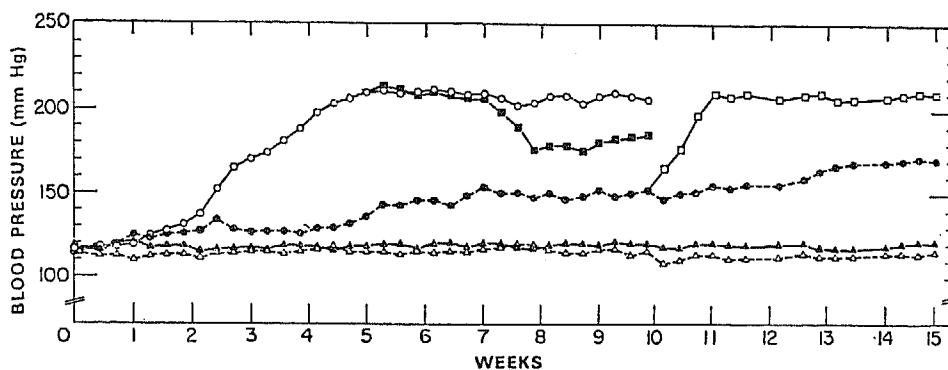


Fig. 2 Uninephrectomized male rats (12 weeks old) were given deoxycorticosterone acetate (5 mg/rat) twice weekly and maintained on saline (○). After 5 weeks of deoxycorticosterone-salt treatment, β -aminopropionitrile (100 mg/kg intraperitoneally) was administered twice daily (■). Another group of rats was given the same dose of β -aminopropionitrile concomitant with the start of deoxycorticosterone-salt treatment (●). After 10 weeks of the combined deoxycorticosterone-salt- β -aminopropionitrile treatment, the β -aminopropionitrile injections were stopped (□). Intact, normotensive rats (▲) and uninephrectomized normotensive rats given the standard dose (100mg/kg) of β -aminopropionitrile (△) served as control. At 10 and 15 weeks some rats were killed and the collagen content of their tissues was measured (Table I and II). Each point represents the mean of values for at least three rats.

いろいろの時期におけるBAPNの作用を検討した。Fig. 2 にその結果を示してある。BAPNは、DOCAによる血圧の上昇を抑制したが、15週後に約170 mmHgの血圧を示した。しかしこの血圧は、DOCA高血圧にくらべかなり低く有意差を示した($P < 0.01$)。高血圧がすでに完成した時期、すなわちDOCA処理5週目よりBAPN100mg/kgを投与した場合、BAPN投与開始2週目より血圧が下降しはじめ、3週後には、DOCA高血圧ラットにくらべ有意差を示すようになった($P < 0.01$)。実験開始10週目よりBAPN投与群の一部ラットにBAPNの投与を停止した場合、血圧はただちに上昇しはじめ、1週間以内で210mmHgになった。一方BAPNは、正常血圧ラットの血圧に何らの影響をも示さなかった。またDOCAやBAPNを処理したラットの体重は、対照群と有意差を示さなかった。

B コラーゲンに対するBAPNの影響

経時的に各群のラットの一部を殺し、血管壁中の可溶性及び不溶性コラーゲン含量を定量した。Table Iに、DOCAとBAPN処理後10週目の結果を示してある。DOCA高血圧においては、腸間膜動脈および大動脈中の可溶性および不溶性コラーゲンいずれも増加していたが、DOCA高血圧ラットにBAPNを

投与することにより、可溶性コラーゲン量が有意に増加するのには、不溶性コラーゲン量が減少し、総コラーゲン量も減少していた。また高血圧完成後にBAPNを投与した場合、可溶性コラーゲンが有意に増加していた。一方不溶性コラーゲンは、高血圧ラットのそれより減少し、総コラーゲン量も減少傾向を示したが有意差を示さなかった。BAPNは、高血圧ラットばかりでなく、正常血圧ラットの血管壁コラーゲン中、可溶性コラーゲン量を増加させ、不溶性コラーゲン量および総コラーゲン量を減少させた。

15週目のラットにおける結果をTable IIに示した。BAPNによるDOCA高血圧ラット血管壁コラーゲンへの影響は、10週目の結果と同様であった。すなわち、可溶性コラーゲンの増加と不溶性および総コラーゲン量の減少を起し、BAPNは、血管壁コラーゲン含量に対して著しい影響を示した。

C 脳内モノアミンに対するBAPNの影響

BAPNのラット脳内モノアミンに対する影響をiproniazidと比較検討し、その結果をTable IIIに示した。BAPNは、iproniazidとは異なり、脳内のnorepinephrine, dopamine含量には影響を及ぼさなかった。

Table I. Collagen content of mesenteric artery (a) and aorta (b) in rats treated with deoxycorticosterone-salt in the presence or absence of β -aminopropionitrile for 10 weeks

(a)	No. of exp.	Collagen content (mg/g tissue)		
		Soluble	Insoluble	Total
Control	6	2.8±0.4	78.8±2.6	81.6±2.5
BAPN	6	3.8±0.2	59.2±2.1**	63.5±4.1**
DOCA-salt	6	4.4±0.6*	91.9±5.2	96.3±6.6
DOCA-salt BAPN	6	5.4±0.5**	68.8±1.3**,+	74.2±2.5**
DOCA-salt after BAPN	5	4.9±0.8*	87.2±3.1	90.1±2.3

(b)	No. of exp.	Collagen content (mg/g tissue)		
		Soluble	Insoluble	Total
Control	6	23.9±2.5	116.2±2.3	149.1±2.6
BAPN	6	32.8±1.8*	90.0±1.9**	122.3±3.1**
DOCA-salt	6	34.4±2.4*	131.8±4.1**	166.2±2.5**
DOCA-salt BAPN	6	37.6±3.5*	97.4±2.6**,+	141.6±5.2**
DOCA-salt after BAPN	5	28.0±2.3	122.2±3.5	150.2±4.6

The rats were treated for 10 weeks as described in the legend of Fig. 2. Each value is the mean±standard error.

* Significantly different from normotensive control, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ++ Significantly different from DOCA-salt, $P < 0.01$.

Table II. Collagen content of mesenteric artery (a) and aorta (b) in rats treated with deoxycorticosterone-salt in the presence or absence of β -aminopropionitrile for 15 weeks

(a)	No. of exp.	Collagen content (mg/g tissue)		
		Soluble	Insoluble	Total
Control	5	2.8±0.2	83.1±2.8	85.9±3.5
BAPN	4	4.9±0.5**	59.3±1.8**	64.2±3.5**
DOCA-salt	3	4.4±0.6*	98.6±7.7	103.0±7.0*
DOCA-salt BAPN	4	9.3±0.3**,+	70.3±2.4**,+	79.6±2.8**

(b)	No. of exp.	Collagen content (mg/g tissue)		
		Soluble	Insoluble	Total
Control	5	37.6±1.1	115.9±1.5	152.9±3.6
BAPN	4	42.1±1.6*	85.6±1.8**	127.7±1.8**
DOCA-salt	3	40.5±1.3	131.9±0.7**	172.4±1.8**
DOCA-salt BAPN	4	41.9±1.2*	94.2±3.5**,+	136.1±3.5**,+

The rats were treated for 15 weeks as described in the legend of Fig. 2. Each value is the mean±standard error.

* Significantly different from normotensive control, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ++ Significantly different from DOCA-salt, $P < 0.01$.

Table III. Catecholamine content in rat brain ($\mu\text{g/g}$ tissue)

Treatment	Norepinephrine	Dopamine
Control	0,300 \pm 0,039	0,283 \pm 0,030
Iproniazid	0,427 \pm 0,046*	0,316 \pm 0,024
BAPN	0,237 \pm 0,035	0,277 \pm 0,027

Iproniazid (75mg/kg) and BAPN (100mg/kg) were administered for 2 days intraperitoneally in 5 rats.

* Significantly different from control, $P < 0.05$.

IV 考 察

これまでに高血圧はコラーゲンの生合成を高め、血管壁へのコラーゲンの沈着を増加させること¹⁾⁻³⁾、降圧剤の reserpine¹⁾, guanethidine²⁾ は、コラーゲンの生合成を抑制すると報告されている。今回は、さらに高血圧とコラーゲン生合成との関係を明らかにするために、BAPNを用いて実験を行った。本実験で用いたBAPNは、lysyl oxidase の特異的な抑制薬であり、コラーゲン線維形成過程で、lysine の酸化が抑制される結果⁸⁾⁻¹⁰⁾、コラーゲン線維架橋が阻害され、安定なコラーゲン形成が行われず結合織の変形を生じ、lathyrism と呼ばれる病態になることが知られている¹¹⁾¹²⁾。一方、架橋形成されたコラーゲン線維は、安定な不溶性コラーゲンとして、強い分子間相互作用を起し、外力に対してより強く抵抗力を持つと考えられている¹²⁾。Fig. 1 に示したように、BAPNは、DOCAによって生ずる血圧の上昇を抑制し、さらに完成した高血圧を低下させた。血圧の下降と付随して、血管壁中のコラーゲン含量も有意に減少させた (Table I, II)。最近大島と緑川¹³⁾は、高血圧時に lysyl oxidase 活性が増加していることと、BAPN投与により血圧の低下と血管壁中のコラーゲンの低下を観察している。その後小川と尾崎¹⁴⁾は、高血圧自然発症ラット (SHR) にBAPNを投与すると血圧の低下を来すと報告している。これらの結果は、本実験結果を支持するものである。BAPNによる降圧作用の発現は、急性には認められず2~3週後から現れてくる。Nissenら¹⁵⁾は、ラット血管壁中のコラーゲンの turnover を検討し、正常血圧時には、半減期が60-70日であるのに、高血圧時には17日と著しく早まっていると報告している。この17日というコラーゲンの半減期間は、今回の実験において

BAPNを投与することによりコラーゲン形成が抑制され、血圧の低下あるいは昇圧抑制が現れてくる期間と一致する (Fig. 2)。

Lysyl oxidase と monoamine oxidase とは同じ酸化脱アミノ酵素であり、monoamine oxidase 阻害剤は、降圧作用を有している¹⁶⁾。BAPNが血管壁コラーゲン生合成を抑制し血圧を低下させている可能性の他に、BAPNそのものが monoamine oxidase 阻害作用により血圧を低下させていることが考えられる。そこで代表的な monoamine oxidase 阻害剤である iproniazid とラット脳内のモノアミンに及ぼす作用を調べ、BAPNに monoamine oxidase 阻害作用があるのかどうかを検討した。Table III に示すように、BAPNは、iproniazid とは異なり脳内アミン含量を増加させず、それゆえBAPNの血圧降下作用が、monoamine oxidase 阻害による可能性はないと思われる。

結合織を構成する分子成分としてコラーゲンがその大部分を占めているが、ほかにプロテオグリカン (酸性ムコ多糖体-タンパク複合体) があげられる。Haussler¹⁷⁾は、高血圧時には、血管壁へのムコ多糖体の取り込みが増加していることを報告し、ムコ多糖体の高血圧時における役割を示唆した。しかしながら、BAPNがコラーゲンの生合成のみならずムコ多糖類の構造や代謝系に影響を及ぼし、その結果降圧作用を起しているのかどうかは、今回の実験からは不明である。

V 結 論

1 特異的な lysyl oxidase 阻害剤の β -aminopropionitrile (BAPN) は、DOCAによって生ずる血圧の上昇を抑制した。しかし正常血圧ラットの血圧には、何らの作用をも示さなかった。

2 BAPNの降圧作用は、高血圧成立後においても認められた。

3 血圧の下降と付随して、大動脈および腸間膜動脈中の不溶性および総コラーゲン含量が減少した。

4 以上の結果から、血管壁コラーゲンは、高血圧発症時ばかりでなく、高血圧の維持にも関与していることが考えられる。

文 献

- 1) Ooshima, A., Fuller, G. C., Spector, S. and Udenfriend, S.: Increased collagen

- synthesis in blood vessels of hypertensive rats and its reversal by antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71 : 3019-3023, 1974
- 2) Iwatsuki, K., Cardinale, G. J., Spector, S. and Udenfriend, S. : Effect of guanethidine on collagen biosynthesis in blood vessels of hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 240 : 278-284, 1979
 - 3) Ooshima, A., Fuller, G. C., Spector, S. and Udenfriend, S. : Collagen biosynthesis in blood vessels of brain and other tissues of the hypertensive rat. *Science*, 28 : 898-900, 1975
 - 4) DeChamplain, J., Krakoff, L. R. and Axelrod, J. : Relationship between sodium intake and norepinephrine storage during the development of experimental hypertension. *Circ Res*, 23 : 479-491, 1968
 - 5) Chvapil, M., McCarthy, D., Madden, J. W. and Peacock, E. E. Jr. : Effect of 1, 10-phenanthroline and desferrioxamine in vivo on prolyl hydroxylase and hydroxylation of collagen in various tissues of rats. *Biochem Pharmacol*, 23 : 2165-2173, 1974
 - 6) Kivirikko, K. I., Laitinen, O. and Prockop, D. J. : Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal Biochem*, 19 : 249-255, 1967
 - 7) Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Langemann, H., Waser, P. C. and Hefti, F. : A fluorometric micromethod for the simultaneous determination of serotonin, norepinephrine and dopamine in milligram amounts of brain tissue. *Biochem Pharmacol*, 23 : 2437-2446, 1974
 - 8) Page, R. C. and Benditt, E. P. : Molecular diseases of connective and vascular tissues. II, amine oxidase inhibition by the lathyrogen, β -aminopropionitrile. *Biochemistry*, 6 : 1142-1248, 1967
 - 9) Siegel, R. C., Pinnell, S. R. and Martin, G. R. : Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase. *Biochemistry*, 9 : 4486-4492, 1970
 - 10) Narayanan, A. S., Siegel, R. C. and Martin, G. R. : Stability and purification of lysyl oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 162 : 231-237, 1974
 - 11) Levene, C. I. and Gross, J. : Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by β -aminopropionitrile (lathyrus factor). *J Exp Med*, 110 : 771-791, 1959
 - 12) Levene, C. I. : Studies on the mode of action of lathyrogenic compounds. *J Exp Med*, 116 : 119-133, 1962
 - 13) Ooshima, A. and Midorikawa, O. : Increased lysyl oxidase activity in blood vessels of hypertensive rats and effect of β -aminopropionitrile on arteriosclerosis. *Jpn Circ J*, 41 : 1337-1340, 1977
 - 14) Ogawa, M. and Ozaki, M. : Inhibitory effect of β -aminopropionitrile on the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol*, 28 : 785-788, 1978
 - 15) Nissen, R., Cardinale, G. J. and Udenfriend, S. : Increased turnover of arterial collagen in hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 451-453, 1978
 - 16) Gessa, G. L., Cuench, E. and Costa, E. : On the mechanism of hypotensive effects of MAO inhibitors. *Ann NY Acad Sci*, 107 : 935-944, 1963
 - 17) Hauss, W. H. : Connective tissue and ageing. Vogel, H. G. (ed.), Vol. 1, pp. 23-33, *Excerpta Medica Amsterdam*, Amsterdam, 1973

(54.12.5受稿)