

# 糖尿病ラットにおける腎 angiotensin converting enzyme(ACE)発現—ACE阻害薬による影響

吉川 博子

Renal angiotensin converting enzyme(ACE) expression in diabetic rats:  
the effect of ACE inhibitors

Hiroko YOSHIKAWA

Department of Nephrology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

Renal excreted angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitor captopril, and renal・hepatic bile excreted ACE inhibitor temocapril, were compared by monitoring serum ACE and renal ACE expression (protein and mRNA) in streptozotocin-induced diabetic rats.

Serum ACE levels did not change in untreated diabetic rats or in those treated with temocapril, compared with normal control rats. However, serum ACE levels significantly increased in diabetic rats treated with captopril after 3 months ( $153.8 \pm 23.0$  vs.  $43.5 \pm 5.5$  IU/l/37°C,  $p < 0.01$ ) and 6 months ( $113.6 \pm 9.3$  vs.  $36.9 \pm 2.9$  IU/l/37°C,  $p < 0.01$ ) compared with normal control rats.

Compared with normal control rats ( $3.6 \pm 0.4$ ), proximal tubular ACE protein expression significantly ( $p < 0.01$ ) decreased in untreated diabetic rats ( $1.6 \pm 1.1$ ), but significantly ( $p < 0.01$ ) increased in diabetic rats treated with captopril ( $3.7 \pm 0.3$ ) and temocapril ( $3.5 \pm 0.4$ ).

Renal ACE mRNA levels decreased in untreated diabetic rats ( $125.5 \pm 20.3$  vs.  $313.3 \pm 53.4$ ,  $p < 0.01$ ) compared with normal control rats for 6 months. Renal ACE mRNA levels tended to increase in diabetic rats treated with captopril ( $184.4 \pm 51.2$  vs.  $125.5 \pm 20.3$ ) and temocapril ( $165.4 \pm 43.2$  vs.  $125.5 \pm 20.3$ ) compared with untreated diabetic rats for 6 months.

In conclusion, diabetic rats had lower proximal tubular ACE protein expression and lower renal ACE mRNA levels compared with normal control rats. Furthermore, both ACE inhibitors increased renal ACE protein and mRNA expression, but differed in their effect on serum ACE levels.

Jpn J Nephrol 1999; 41: 486-492.

**Key words:** angiotensin converting enzyme(ACE), ACE inhibitor, ACE mRNA, ACE protein, kidney

## 緒 言

糖尿病では血漿 prorenin 高値<sup>1)</sup>を伴う低レニン血症がある<sup>2)</sup>。糖尿病性腎症では血清 angiotensin converting enzyme(ACE)活性について高いという報告<sup>3,4)</sup>、低いという報告<sup>5,6)</sup>、あるいは変化がないという報告<sup>7,8)</sup>があり、腎 ACE 活性についても高いという報告<sup>9)</sup>、低いという報告<sup>4)</sup>、あるいは変化がないという報告<sup>2)</sup>がある。腎内 renin・angiotensin 系の亢進があるか否かについてもいまだ十分に

は解明されていない。それにもかかわらず、糖尿病性腎症進展防止に ACE 阻害薬が有効であることは広く認められている<sup>8,9)</sup>。

本研究では糖尿病ラットを用い、糖尿病性腎症における血清 ACE 活性、腎 ACE 蛋白の発現、腎 ACE mRNA 量を検討すると同時に、腎排泄性の captopril<sup>10)</sup>と腎・胆汁排泄性の temocapril<sup>11)</sup>の間に ACE 阻害薬としての効果に差異があるか否かも検討した。

## 対象と方法

### 1. 実験動物

体重 220~240 g の雄性 Wister 系ラットに 50 mg/kg の streptozotocin(STZ) を尾静脈より投与し、隨時血糖が 300 mg/dl 以上を示したものを糖尿病ラットとした。糖尿病ラットはインスリンによる血糖コントロールを行わず、全経過中隨時血糖を 300 mg/dl 以上に維持した。STZ 誘発性糖尿病ラットのうち、captopril(三共)を投与した群を I 群(n=8)、temocapril(三共)を投与した群を II 群(n=8)、未治療(何も投与しない)群を III 群(n=8)とした。また、正常ラットをコントロールの IV 群(n=8)とした。captopril, temocapril は原末を飲水中に各々 75 mg/l, 5 mg/l の濃度に溶解し、free drinking にて投与した。糖尿病ラットを作成後、直ちに実験を開始した。体重、血圧、隨時血糖、尿中アルブミン排泄量、血清 ACE 活性値(1カ月目は測定せず)、クレアチニクリアランスを 1 カ月、3 カ月、6 カ月後に測定した。尿中アルブミンは 24 時間蓄尿により得られた尿検体で、Keen ら<sup>12)</sup>の方法に準じた 2 抗体法 radioimmunoassay を行い測定した。血清 ACE 活性の測定は笠原法<sup>13)</sup>にて行った。クレアチニクリアランスは 24 時間蓄尿量(V)、血清(P)および尿中(U)クレアチニン値を測定し、UV/P の式より求めた。3 カ月後に各群の半数のラットを、6 カ月後に残りの半数のラットを pentobarbital 腹腔内麻酔下に開腹し、採血、両腎摘出後に屠殺した。片腎の一部は ACE 免疫組織染色用に OCT compound で包埋後、新鮮凍結した。対側腎は直ちに液体窒素で急速凍結し RNA の抽出に供した。

### 2. ACE の免疫組織染色の半定量的評価

ACE 蛋白の発現を、新鮮凍結切片を用い酵素抗体法間接法<sup>14)</sup>にて検討した。一次抗体は抗ヒト ACE マウスモノクロナール抗体(Immunobiological Laboratory, 藤岡)を使用した。この抗体のラット ACE との交叉反応は免疫化学的滴定にて確認された。二次抗体はヤギ horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体(Tago, Camarillo, USA)を使用した。コントロール切片には一次抗体の代わりに非免疫マウス IgG 抗体(Tago, Camarillo, USA)を使用した。各ラットごと 10 個、各群 80 個の近位尿細管を 100 倍にて観察した。各近位尿細管ごとに全く染まっていないものを 0 点、非常に強く染まっているものを 4 点とし、その間を 1, 2, 3 点とした。観察尿細管ごとにスコアを与え、その平均値を各群のスコアとし半定量的に評価した。

### 3. RNA の抽出とノーザンプロット解析

腎組織から全 RNA をイソゲン(ニッポンジーン、富山)を使用し抽出した。次いで mRNA の発現をノーザンプロット法で解析した。すなわち、全 RNA 各 15 μg を検体として、これをホルムアルデヒドで処理した。1%アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜に転写し、<sup>32</sup>P-dCTP でラベルしたヒト ACE cDNA プローブ(PB 3519)<sup>15)</sup>とハイブリダイズさせた。0.2×SSC, 0.1% SDS(65°C)で洗浄しオートラジオグラフィーを行った。mRNA の発現は RIイメージングアナライザ Fuji BAS 2000(富士写真フィルム・東京)を用い、各オートラジオグラムを半定量化した。インターナルコントロールとして β-アクチンを用いた。

Table 1. Body weight, blood pressure, blood glucose, urinary albumin and creatinine clearance

	Group	Body weight (g)	Blood pressure (mmHg)	Blood glucose (mg/dl)	Urinary albumin (μg/day)	Creatinine clearance (ml/min/kg)
1 month	I (n=8)	272.5±36.0*	109.5±11.3	507±112*	500.1±253.4	13.6±1.9
	II (n=8)	245.0±33.9*	97.5±17.8	469±93*	298.0±258.3	16.2±3.0**
	III (n=8)	252.5±32.7*	133.8±16.5*	461±95*	404.3±173.6	17.5±5.3*
	IV (n=8)	387.5±8.3	105.1±7.0	130±17	296.0±300.5	11.0±4.3
3 months	I (n=8)	302.5±41.8*	94.5±11.9	564±64*	977.1±500.0	9.6±2.2*
	II (n=8)	267.5±39.6*	95.0±19.5	508±92*	1,359.5±926.7	10.8±1.7*
	III (n=8)	283.8±45.8*	95.8±14.9	577±55*	1,673.8±1,796.0	10.3±1.5*
	IV (n=8)	490.0±30.0	101.6±18.8	181±35	174.3±48.3	6.2±2.1
6 months	I (n=4)	315.0±62.2*	90.8±6.8	573±47*	816.5±236.3	10.2±2.0
	II (n=4)	257.5±40.2*	84.8±14.1	551±85*	1,915.0±1,700.8	10.4±2.6
	III (n=4)	280.0±86.0*	106.5±18.8	600±0*	829.0±393.5	9.3±2.6
	IV (n=4)	565.0±29.6	ND	244±66	215.0±132.4	6.5±0.7

Values are expressed as mean±SD. \*p<0.01 compared with group IV, \*\*p<0.05 compared with group IV  
ND : not done

Table 2. Serum ACE levels

	Group	Serum ACE (IU/l/37°C)
3 months	I (n=4)	153.8±23.0
	II (n=4)	37.4±19.7*
	III (n=4)	48.5±6.3*
	IV (n=4)	43.5±5.5*
6 months	I (n=4)	113.6±9.3
	II (n=4)	35.5±5.2*
	III (n=4)	45.6±11.9*
	IV (n=4)	36.9±2.9*

Values are expressed as mean±SD.

\*p<0.01 compared with group I

#### 4. 統計学的処理

結果は、各群における平均値±標準偏差で表した。各群間の有意差は一元分散分析で検定した。

### 結 果

#### 1. 体重、血圧、血糖、尿中アルブミン排泄量およびクレアチニンクリアランス(Table 1)

体重は健常群(IV)に比し1, 3, 6カ月目とも糖尿病群(I, II, III)では有意に(p<0.01)少なかったが、糖尿病3群間ではどの時期においても有意差は認められなかつた。

血圧は健常群(IV)に比し1カ月目のIII群で有意に(p<0.01)高値だったが、その他は有意差を認めなかつた。

血糖は健常群(IV)に比し1, 3, 6カ月目とも糖尿病群(I, II, III)では有意に(p<0.01)高値であったが糖尿病3群間ではどの時期においても有意差は認められなかつた。

尿中アルブミン排泄量は健常群(IV)に比し糖尿病群(I, II, III)は有意ではなかったが高値の傾向があつた。

クレアチニンクリアランスは健常群(IV)に比し1カ月目のII群(p<0.05), III群(p<0.01), 3カ月目のI群(p<0.01), II群(p<0.01), III群(p<0.01)が有意に高値だったがその他は有意差を認めなかつた。

#### 2. 血清 ACE 活性値(Table 2)

3カ月目の血清 ACE 値(IU/l/37°C)は健常IV群(43.5±5.5)に比し糖尿病未治療のIII群(48.5±6.3)と糖尿病 temocapril 投与のII群(37.4±19.7)では有意差はなかったが、糖尿病 captorpril 投与のI群では有意の高値を(153.8±23.0, p<0.01)示した。糖尿病3群間の比較でもI群はII, III群に比し有意の(p<0.01)高値を示し、II群はIII群に比し低下傾向を示した。

6カ月目の血清 ACE 値(IU/l/37°C)も3カ月目と同じく、健常IV群(36.9±2.9)に比しIII群(45.6±11.9)とII群(35.5±5.2)は有意差がなく、I群では有意の高値を(113.6±9.3, p<0.01)示した。糖尿病3群間の比較でもI群はII, III群に比し有意の(p<0.01)高値を示し、II群はIII群に比し低下傾向を示した。

すなわち、糖尿病ラットにおいて temocapril は血清 ACE 値を低下させる傾向があり、captopril は血清 ACE 値を有意に上昇させることが示された。

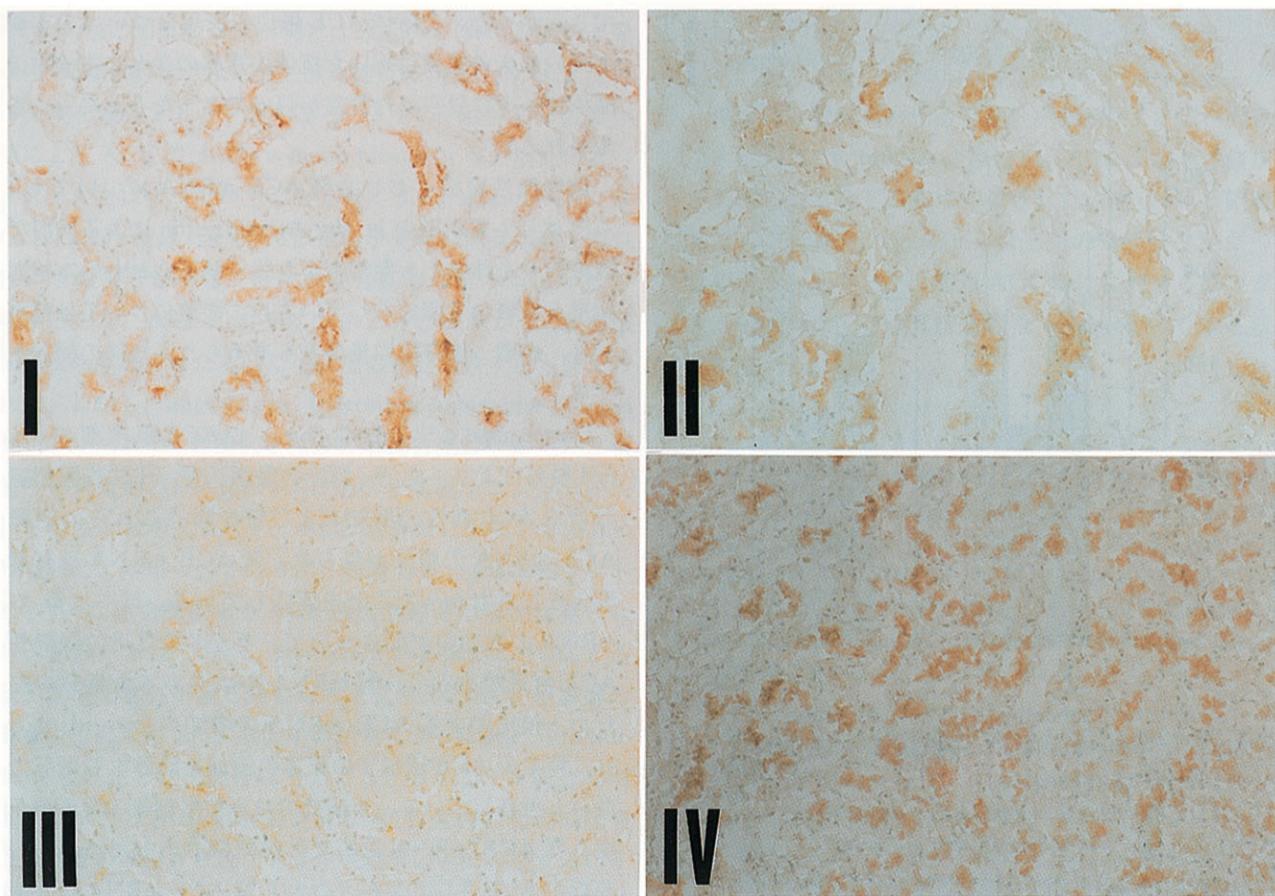
#### 3. 腎 ACE 蛋白の発現(Fig. 1, Table 3)

代表的な腎近位尿細管 ACE 蛋白の発現は Fig. 1 に示すごとくであった。半定量的評価を Table 3 に示した。健常IV群(3.6±0.4)に比し糖尿病未治療のIII群(1.6±1.1)では有意に(p<0.01)低下し、captopril 投与のI群(3.7±0.3), temocapril 投与のII群(3.5±0.4)ではIII群に比し有意に(p<0.01)強い発現を示し、健常IV群と同程度に回復していた。糸球体 ACE 蛋白の発現は全群いずれも trace レベルで差違はなく、STZ 糖尿病ラットにおける腎 ACE 蛋白発現の再分布は確認できなかつた。

#### 4. 腎 ACE mRNA(ノーザンプロット解析、半定量)(Fig. 2, 3)

Fig. 2 に示すごとく、ノーザンプロット解析で腎、肺は28Sに、精巣は28Sより短いバンドが見られた。Shiota ら<sup>10</sup>, Jonsson ら<sup>11</sup>の報告でもラットの somatic ACE mRNA である腎 ACE mRNA は28Sに、germinal ACE mRNA は28Sより短いバンドが認められており、本研究でラットの腎および肺に見られた28SのバンドはACE mRNAと判断した。健常IV群に比し、糖尿病の3群間では未治療のIII群でシグナルは弱くなっていたが、captopril 投与のI群と temocapril 投与のII群では健常に近いレベルまでシグナルが強くなっていた。

Fig. 3 に Fig. 2 のノーザンプロット解析の結果を半定量し示した。3カ月目では健常IV群(176.6±74.0)に比し糖尿病未治療のIII群で発現の低下傾向を(117.4±31.6)示したが、低下したIII群に比し、captopril 投与のI群(216.7±197.0)および temocapril 投与のII群(172.5±35.6)は再び発現の回復傾向が見られた。6カ月目でも健常IV群(313.3±53.4)に比し糖尿病未治療群のIII群で発現の有意な低下(125.5±20.3, p<0.01)を示したが、低下したIII群に比し captopril 投与のI群(184.4±51.2)および temocapril 投与のII群(165.4±43.2)で同様に発現の回復傾向を示した。I, II群間で有意差はなかつた。



**Fig 1. Light microscopic findings of ACE immunostaining of proximal tubulus (PT)**

In diabetic rat without treatment (III), ACE immunostaining in PT was decreased compared with normal control rat (IV). In both diabetic rats treated with captopril (I) and temocapril (II), ACE immunostaining in PT was more intense than diabetic rat without treatment (III). ( $\times 100$ )

**Table 3. Histological score for semiquantitative analysis of proximal tubulus (ACE immunostaining)**

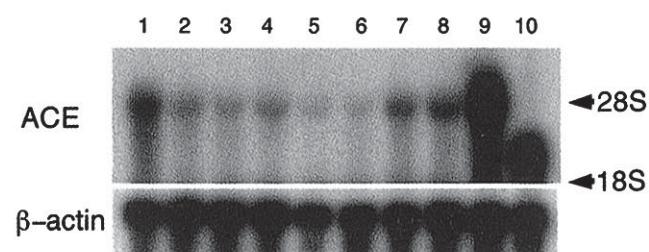
Group	Score
I (n=8)	3.7±0.3*
II (n=8)	3.5±0.4*
III (n=8)	1.6±1.1
IV (n=8)	3.6±0.4*

Values are expressed as mean±SD.

\*p<0.01 compared with group III

## 考 察

本研究では、ラットの糖尿病性腎症において近位尿細管のACE蛋白の発現の低下と腎ACE mRNAの減少があり、これらの異常が血清ACE値とは必ずしも関係せずに修復されることが明らかにされた。



**Fig 2. Northern blot analysis of rat ACE mRNA**

1~6 : kidney of diabetic rat

1. treated for 3 months with captopril, group I

2. treated for 6 months with captopril, group I

3. treated for 3 months with temocapril, group II

4. treated for 6 months with temocapril, group II

5. not treated for 3 months, group III

6. not treated for 6 months, group III

7 : kidney of normal control rat for 3 months, group IV

8 : kidney of normal control rat for 6 months, group IV

9 : lung of normal control rat

10 : testis normal control rat

Signal of 28S appears to be relatively lower in 5, 6 (group III, diabetic rat, not treated) compared to 7, 8 (group IV, Control).

Signal of 28S appears to be relatively recovered in 1, 2 (group I, diabetic rat treated with captopril) and 3, 4 (group II, diabetic rat treated with temocapril) compared to 5, 6 (group III, diabetic rat, not treated).

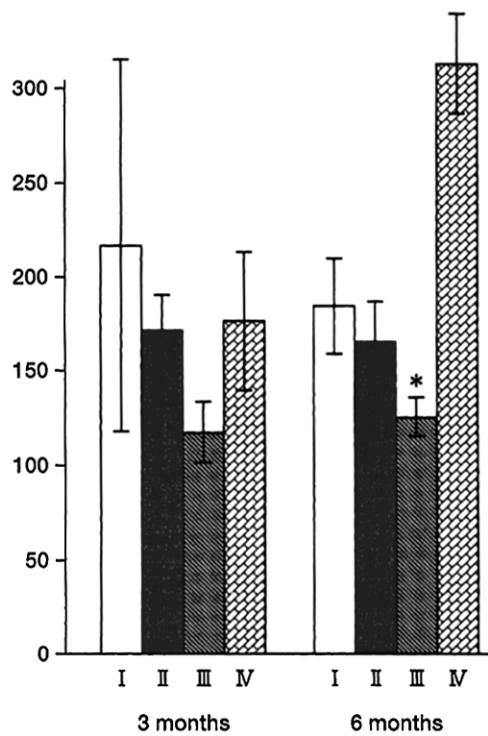


Fig 3. Semiquantitative analysis of ACE mRNA in the rat kidney

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*p < 0.01 compared with group IV.

糖尿病における腎 ACE 蛋白の発現に関する報告は少ないが近位尿細管の ACE 蛋白の発現の減弱が認められた点では過去の報告<sup>8,18)</sup>と一致していた。正常ラットでは塩分制限で血清 ACE 活性と腎 ACE 活性が増加し、塩分過多では血清 ACE 活性は増加するが腎 ACE 活性は変化しないと報告されている<sup>19)</sup>。本検討の糖尿病ラットでは、塩分摂取量や循環血漿量は検討していないが、体重は健常コントロールラットに比し著しい低値を示しており、脱水状態で塩分摂取量は減少していた可能性が高い。それにもかかわらず本検討の糖尿病ラットでは、血清 ACE 活性は増加せず尿細管 ACE 蛋白の発現は有意に減少していた。これは、正常ラットの反応と異なっており、糖尿病状態においては sodium-volume-renin-angiotensin-axis の調整の異常がある<sup>8)</sup>ことに起因したのではないかと思われる。Anderson ら<sup>8)</sup>は糖尿病ラットの ACE 蛋白の発現は尿細管では減少し、糸球体では増加すると報告しており、ヒトのインスリン非依存性糖尿病に伴う糖尿病性腎症においてもこれと同じ腎 ACE 蛋白の発現の再分布が確認されている<sup>20)</sup>。

本研究では糸球体 ACE 蛋白の発現については健常・糖尿病ラット間での差異ではなく、ACE 阻害薬の糸球体 ACE 蛋白の発現へ及ぼす変化は少なくとも光顕レベルでは確認

できなかった。糸球体 ACE 蛋白の発現についての本検討と他の報告の差異は用いた抗体の差異のほかに本検討の糖尿病ラットに見られた腎症が軽症であったことにもよると思われる。

糖尿病性腎症における腎 ACE mRNA についても Lai ら<sup>21)</sup>はヒト腎組織の *in situ* hybridizationによる検討で、尿細管・糸球体とも健常者より強く認められたと本検討の結果とは異なる報告をしている。この差については種差以外に、病期、塩分摂取量の差も考えられ、今後の検討を要する。

Costerousse ら<sup>22)</sup>は健常ラットで ACE 阻害薬の enalapril 投与により、血清、肺、大動脈、腎、十二指腸組織における ACE 活性の増加および腎を除くこれらの組織の ACE mRNA の増加が見られ、腎 ACE mRNA は有意の変化を示さなかったことを報告している。彼らは腎 ACE mRNA の増加の欠如について、ラットでは近位尿細管の ACE 含量が少なく、腎 mRNA 中に占める含量が少ないと考察している。本研究では近位尿細管の免疫染色強度と腎 ACE mRNA 量の変化が同様であった点から、腎局所の ACE 生成の回転すなわち腎 ACE mRNA 量と尿細管で encode される酵素の直接的関係が示唆された。

ACE 阻害薬投与後に血清 ACE 値の増加が見られるという報告<sup>23~26)</sup>は Costerousse らの報告<sup>22)</sup>以前にもある。その機序は不明であるが、健常ラットに captopril を投与すると肺内皮での ACE 合成が誘発されるため血清 ACE 活性値が上昇するとの報告もあり<sup>27,28)</sup>、肺を主とし、精巣を除くその他の組織でも ACE 遺伝子の転写と ACE の合成・分泌の増加があるため<sup>22,29)</sup>ではないかと考えられてきた。糖尿病ラットにおける本研究では captopril、temocapril のいずれによても全腎での ACE mRNA および尿細管 ACE 蛋白の発現は回復しており、ACE 阻害薬により腎での主たる ACE 蛋白の発現部位である尿細管での ACE 遺伝子の転写、ACE 合成の増加が生じた可能性が示唆され、上述の機序をさらに支持する所見が得られた。腎 ACE 活性は肺に比べると非常に低く、血清 ACE 値に及ぼす影響は少ないと考えられる。本検討での血清 ACE 値の増加は captopril のみで認められ、temocapril では認められなかった点からは、血清 ACE 値にも影響を及ぼす肺での ACE 発現の増加は ACE 阻害薬の種類により異なる可能性もあるのではないかと推察された。

糖尿病ラットでの ACE 阻害薬による近位尿細管での

ACE 発現の回復機序は不明ではあるが、1) ACE 遺伝子発現の negative feedback を生じる物質の消失、2) ACE 遺伝子発現を増強させる物質の蓄積、3) ACE 阻害薬の直接作用による ACE 遺伝子の somatic promotor 5'の活性化のいずれかまたはすべてが生じたと考えうる。angiotensin II (AII) は肺・精巢・脳で ACE 遺伝子発現の抑制効果を持つという報告<sup>30)</sup> からは、近位尿細管にも AII receptor は存在するので、ACE 阻害薬による AII の抑制が ACE 遺伝子発現の増加をもたらした可能性の検討を要すると考えられた。しかし、angiotensin I receptor antagonist や renin inhibitor では ACE 遺伝子発現の増加は生じなかったと報告<sup>22)</sup> されており、AII が ACE 遺伝子発現をコントロールしているとは考えにくい。ACE 阻害薬による bradikinin の増加はよく知られているが、血清 kininogen 欠如ラットでも ACE 阻害薬による ACE 遺伝子発現の増加は見られたと報告<sup>22)</sup> されており、bradikinin の蓄積により ACE 遺伝子発現の増強が生じたとも考えにくい。ACE 阻害薬の直接作用による ACE 遺伝子の活性化が somatic promotor にのみ生じた可能性は考えうる。しかし、本研究の糖尿病ラットの ACE 阻害薬による ACE 蛋白の発現の回復は尿細管のみに見られており、尿細管のみに存在するいまだ知られていない ACE の基質や産物を介して ACE 遺伝子発現の回復が生じた可能性も否定できない。また、ACE 阻害薬による ACE 発現の増加は ACE 阻害薬投与量に比例して増える<sup>22)</sup> と報告されており、本研究での ACE 阻害薬投与量が不十分であったために近位尿細管での ACE 発現の増加が見られたという可能性は少ないのでないかと思われる。一方、糖尿病ラットにおける ACE 阻害薬の投与が糸球体・尿細管両者の ACE 蛋白の発現を減ずるという本研究とは異なる報告<sup>8)</sup> もあり、ACE 阻害薬投与下の腎 ACE 蛋白の発現の変化がラットの種類、塩分摂取量、ACE 阻害薬の種類、治療期間の差などに影響される可能性も否定できない。

腎 ACE 蛋白、ACE mRNA の主な発現部位が近位尿細管であることを考えれば、本研究で検討した全腎の ACE mRNA は主として近位尿細管 ACE mRNA を反映しており、必ずしも糸球体 ACE mRNA を反映しているとはいえない。したがって、ACE 阻害薬により腎 ACE mRNA 量が増加し近位尿細管 ACE 蛋白の発現が強くなったという本研究の結果は、糸球体 ACE 活性が ACE 阻害薬で減少し糖尿病性腎症の糸球体病変が抑制されるという従来の考え方と矛盾するものではないと思われた。

## 結語

糖尿病性腎症における腎近位尿細管 ACE 蛋白発現の低下と総腎 ACE mRNA の減少が、ACE 阻害薬で修復される傾向にあることが明らかにされた。同じ ACE 阻害薬である captopril と temocapril は上記の腎保護作用については差異がなかったが、血清 ACE 活性に対する効果が異なり、temocapril では有意差はなく captopril では有意の上昇が認められた。

稿を終えるにあたり、ご指導を頂きました東邦大学腎臓学教室長谷川 昭教授、直接ご指導を頂きました同 水入苑生助教授、ノーザンブロット法について直接ご指導頂きました同 第2病理学教室伊藤金次助教授、ならびにご指導ご協力を頂きました同 第2病理学教室田村晴美技術専門員、同 総合研究部測定室佐藤 勇技術専門員、同 医学情報学研究室西村千秋教授、同 腎臓学教室諸兄に深謝いたします。また、ACE cDNA を供与頂いた Prof. Soubrier に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第39回日本腎臓学会総会(1996年、倉敷)で発表した。

## 文献

- Misbin RI, Grant MB, Pecker MS, Atlas SA. Elevated levels of plasma prorenin (inactive renin) in diabetic and non-diabetic patients with autonomic dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64 : 964-8.
- Erman A, Vandyk DJ, Chen-Gal B, Giler IDS, Rosenfeld JB, Boner G. Angiotensin converting enzyme activity in the serum, lung and kidney of diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 1993 ; 23 : 615-20.
- Lieberman J, Sastre A. Serum angiotensin-converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1980 ; 93 : 825-6.
- Maeda S, Kikkawa R, Haneda M, Togawa M, Koya D, Horide N, Kajiwara N, Uzu T, Shigeta Y. Reduced activity of renal angiotensin-converting enzyme in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications* 1991 ; 5 : 225-9.
- Aoyagi T, Wada T, Kojima F, Nagai M, Akanuma Y, Akanuma H, Umezawa H. Relation of blood glucose levels to the changes in plasma levels of various hydrolytic enzyme in diabetic patients. *Biochem Int* 1985 ; 10 : 821-7.
- Trujillo A, Eggema P, Barrett J, Tuck M. Renin regulation in type II diabetes mellitus: influence of dietary sodium. *Hypertension* 1989 ; 13 : 200-5.
- Giampietro O, Lenzi S, Sampietro T, Miccoli R, Navalesi R. Serum angiotensin-converting enzyme in diabetes mellitus: a negative report. *Enzyme* 1986 ; 35 : 102-5.
- Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angioten-

- sin system in diabetes : functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol* 1993 ; 264 : F477-86.
9. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 1456-62.
  10. 蔵本 築. 本態性高血圧症に対するアンジオテンシン変換阻害剤 Captopril(CS-522)の降圧効果. *薬理と治療* 1981 ; 9 : 4073-101.
  11. Oizumi K, Koike H, Sada T, Miyamoto M, Nishino H, Matsushita Y, Iijima Y, Yanagisawa H. Pharmacological profiles of CS-622, a novel angiotensin converting enzyme inhibitor. *Jpn J Pharmacol* 1988 ; 48 : 349-56.
  12. Keen H, Chlouverakis C. An immunoassay method for urinary albumin at low concentrations. *Lancet* 1963 ; ii : 913-4.
  13. Kasahara Y, Ashihara Y. Colorimetry of angiotensin I -converting enzyme activity in serum. *Clin Chem* 1981 ; 27 : 1922-5.
  14. Wilson MB, Nakane PK. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In : Knapp W, Holubar K, Wick G (eds). *Immunofluorescence and related staining techniques*. Amsterdam : Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978 : 215-24.
  15. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, Jhon M, Tregeair G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I -converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 9386-90.
  16. Shiota N, Miyazaki M, Okunishi H. Increase of angiotensin converting enzyme gene expression in the hypertensive aorta. *Hypertension* 1992 ; 20(2) : 168-174.
  17. Jonsson JR, Frewin DB, Head RJ. The effect of captopril treatment and its withdrawal on the gene expression of the renin-angiotensin system. *Blood Press* 1994 ; 3(1-2) : 97-105.
  18. Mizuiri S, Kobayashi M, Nakanishi T, Yoshikawa H, Miyagi M, Tanegashima M, Sakai K, Hayashi I, Fushimi T, Hasegawa A. Renal angiotensin-converting enzyme localization in diabetic rats and the effect of low protein diet. *Nephron* 1997 ; 76 : 186-91.
  19. Fox J, Guan S, Hymel AA, Navar LG. Dietary Na and ACE inhibition effects on renal tissue angiotensin I and II and ACE activity in rats. *Am J Physiol* 1992 ; 262 : F902-9.
  20. Mizuiri S, Yoshikawa H, Tanegashima M, Miyagi M, Kobayashi M, Sakai K, Hayashi I, Aikawa A, Ohara T, Hasegawa A. Renal ACE immunohistochemical localization in NIDDM patients with nephropathy *Am J Kidney Dis* 1998 ; 31 : 301-7.
  21. Lai KN, Leung JCK, Lai KB, To WY, Yeung VTF, Lai FMM. Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens* 1998 ; 16(1) : 91-102.
  22. Costerousse O, Allegrini J, Clozel JP, Ménard J, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme inhibition but not angiotensin II suppression alters angiotensin I converting enzyme gene expression in vessels and epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 ; 284 : 1180-7.
  23. Larochelle P, Genest J, Kushel T, Boucher R, Gutkowska Y, McKinstry D. Effect of captopril(SQ 14225)on blood pressure, plasma renin activity and angiotensin I -converting enzyme activity. *Can Med Assoc J* 1979 ; 121 : 309-13.
  24. Fyrquist F, Forslund T, Tikkanen I, Grönhagen-riska C. Induction of angiotensin I -converting enzyme in rat lung with captopril(SQ 14225). *Eur J Pharmacol* 1980 ; 67 : 473-5.
  25. Boomsma F, Bruyn JHB, Derkx FHM, Schalekamp MADH. Opposite effects of captopril on angiotensin I -converting enzyme 'activity' and 'concentration' ; relation between enzyme inhibition and long-term blood pressure response. *Clin Sci* 1981 ; 60 : 491-8.
  26. Sassano P, Chatellier G, Billaud E, Alhenc-gelas F, Corbol P, Ménard J. Treatment of mild to moderate hypertension with or without the converting enzyme inhibitor enalapril. *Am J Med* 1987 ; 83 : 227-35.
  27. Kokubu T, Ueda E, Ono M, Kawabe T, Hayashi Y, Kan T. Effects of captopril(SQ 14,225)on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal rats. *Eur J Pharmacol* 1980 ; 62 : 269-75.
  28. Forslund T. Effect of time and dose on angiotensin converting enzyme during captopril treatment in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 1983 ; 52 : 201-4.
  29. King SJ, Oparil S. Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am J Physiol* 1992 ; 263 : C743-9.
  30. Berecek KH, King SJ, Wu JN, Oparil S, Rydzewski B, Raizada M. Effects of angiotensin II(AII) in the presence and absence of subtype-specific AII blockers on angiotensin converting enzyme(ACE) gene expression in central nervous system tissue. *FASEB J* 1992 ; 6 : A1578.