実験的甲状腺機能異常ラットにおける血漿,
心房及び視床下部心房性 Na 利尿ペプチド
(ANP) の変動について

獨協医大・内分泌内科

村 松 弘 章, 鈴 木 義 信, 土 屋 時 彦
大 武 龍 介, 橋 上 好 久, 小 堀 博 文
堀 越 健太郎, 鈴 木 仁, 下 田 新 一

Altered α Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Concentrations
in Plasma, Atria and Hypothalamus in Experimentally
Induced Hyper- and Hypothyroid Rats

**Hiroaki MURAMATSU, Yoshinobu SUZUKI,
Tokihiko TSUCHIYA, Rhusuke OHTAKE,
Yoshihisa HASHIGAMI, Hirobumi KOBORI,
Kentaro HORIKOSHI, Hitoshi SUZUKI
and Shin-ichi SHIMODA**

Department of Endocrinology, Internal Medicine, Dokkyo
University School of Medicine, Mibu, Tochigi 321-01, Japan

In order to assess a possible involvement of thyroid hormone in atrial natriuretic peptide (ANP), experimentally induced hyper- and hypothyroid rats were employed, and the immunoreactive rat ANP (IR-ANP) concentrations in plasma, atria and brain regions including the hypothalamus were measured by a specific radioimmunoassay. Plasma IR-ANP concentration in hypothyroid rats was 14.5 ± 2.9 (mean $\pm$ SEM) fmol/ml, significantly lower than that in control rats ($p < 0.05$ vs control of 24.9 ± 9.7 fmol/ml). Plasma IR-ANP concentration in hyperthyroid rats was 66.4 ± 9.7 fmol/min, significantly higher than that in the controls ($p < 0.01$). Atrial IR-ANP concentration in hyperthyroid rats was significantly lower than that in the controls (79.9 ± 11.1 nmol/g vs 133.5 ± 21.2 nmol/g (control), $p < 0.05$), though no significant change was observed in atrial IR-ANP concentration in hypothyroid rats.

While hypothalamic ANP concentration in hypothyroid rats was significantly lower than that in the controls (17.5 ± 3.5 pmol/g vs 31.9 ± 1.9 pmol/g (control), $p < 0.05$), there was no significant change of that in the hyperthyroid rats. On reverse phase high performance liquid chromatography, the major peak in plasma and hypothalamus extract

was thought to be identical to synthetic α -rat ANP (1-28). These results may suggest that in the hyperthyroid state an excessive amount of ANP is released from atria into the blood, and that in the central nervous system thyroid hormone involve ANP metabolism being different from the atrium.

結 言

1981年, De Bold⁵⁾らは, ラットの心房抽出物が著明な Na 利尿作用, 降圧作用を有することを報告した。その御寒川, 松尾⁹⁾らにより心房から一群の Na 利尿作用を有するペプチドが単離同定され, 心房性 Na 利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP)と総称された。本ペプチドは水, Na 利尿作用や血管平滑筋拡張作用を有し, 体液バランスの調節に関与することが報告されている⁶⁾¹³⁾¹⁹⁾。臨床的にはうっ血性心不全²³⁾, 慢性腎不全²⁾²¹⁾, 妊娠⁴⁾等体液の増加を生ずる病態において血漿 ANP 濃度が上昇する。一方, 脳内にも ANP が存在する事が免疫組織学的に証明されており, 特に視床下部周辺に高濃度存在し, 神経ペプチドとしての ANP の生理学的重要性が増している¹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²²⁾。

循環動態の変動の激しい甲状腺疾患においても血漿および心房 ANP が変動する事が知られているが¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾²⁰⁾²⁴⁾ この病態下での脳内, 殊に視床下部 ANP の変動に関する報告は我々の検討した範囲では認められなかった。そこで今回我々は実験的甲状腺機能異常ラットを作成し, 血漿および心房 ANP 濃度に加え, 視床下部を含む脳内 ANP 濃度を測定しその変動の有無について若干の検討を加えたので報告する。

対 照 と 方 法

250-300g の Wister 系ラットを用いて, DL-thyroxine (T_4 ; Sigma, Fine Chemicals, St. Louis, MO., USA) 20 μ g/日, 2週間腹腔内投与群 (T_4 群, $n=7$), 0.1% Methylmelcaptoimidazole 4週間飲料水群 (MM1群, $n=6$) 及び正常対象として同世代の無処理群 (対照群, $n=8$) の三群を作成し, 血中 T_4 , 血漿, 心房及び脳内 ANP 濃度を測定した。

全てのラットは断頭屠殺し, 血液採取後ただちに左右心房を摘出し両者をあわせて, 又, 脳の部位別検討は Glowinski & Iversen の方法⁷⁾に準じて組織摘出を行なった。血液は 1ml あたり 400 KIU の aprotinine (Sigma, USA) 及び 1mg の Ethylene diamine tetraacetate (EDTA; Wako Pure Chemical Industries Ltd, Tokyo, Japan) 加プラスチックチューブに採取し, 750xg にて遠心後血漿分離した。血漿は既報の方法にて Seppak C_{18} cartridge を用いて抽出後測定した²¹⁾。又, 心房, 視床下部組織は秤量後, 100°C, 0.5M 酢酸 1ml にて10分間煮沸抽出し ANP 測定に供した。心房抽出液は ANP 高濃度のため測定に際してアッセイ用緩衝液にて1,000倍ないし10,000倍に希釈後測定した。

ANP 濃度の測定は¹²⁵I-rat ANP (Amersham Japan Co. Tokyo, Japan) 及びrabbit anti ANP serum (Peninsula Lab Inc., CA, USA) を用いて RIA 系を組み立てて行なった。アッセイ用緩衝液として0.1% triton X-100 (Sigma, USA) 0.3% Bovine serum albumin (BSA; Sigma, USA), 10mM EDTA, 7.5mM Na_2N_3 (Wako Pure Chem) 加 60mM Phosphate Buffer を用い, 血漿抽出液 200 μ l, 希釈心房抽出液 10 μ l 及び脳抽出液 50 μ l を加えて total volume

400 μ l ないし 800 μ l で上記の RIA 系にて 4°C, 5日間 incubation し, dextran coated charcoal (DCC) 法にて B・F 分離を行なった。測定を行なった ANP 免疫活性の α -rat ANP 標準品との異同を検討する為に逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分画を行なった。高速液体クロマトグラフィーはポンプ LC-6A, カラムオープン CTO 6A, システムコントローラー CTL6B よりなる Shimadzu LC system (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) と μ Bondapak C₁₈ column (10 μ m, 3.9 $\times$ 300mm, Waters Japan. Co.) をもちいた。0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 加 10%-60% acetonitrile (ACN) H₂O による linear gradient にて, 1ml/min の流速で, 分画を行なった。血中遊離 T₄ は日本 DPC 社の RIA キットを用いて測定した。結果は全て mean $\pm$ SEM で表わし, 統計学的処理は分散分析および multiple t test を用いて行なった。

結 果

T₄ 群, MMI 群及び対照群の血中 T₄ 値は, 11.3 $\pm$ 1.4, 0.6 $\pm$ 0.2 及び 1.9 $\pm$ 0.2ng/dl と, 対照群に比して T₄ 群及び MMI 群では各々有意 (p<0.05) の変化を示し, 甲状腺機能異常ラットが作成された。

Fig. 1 に示す如く T₄ 群及び MMI 群の血漿 ANP 濃度は 66.4 $\pm$ 9.7fmol/ml 及び 14.5 $\pm$ 2.9 fmol/ml であり, 対照群 (24.9 $\pm$ 3.4fmol/ml) に比して各々有意な増加 (p<0.01) ないし減少 (p<0.05) を示し血中 T₄ 値と有意の正相関を認めた (P<0.01; 図略)。心房 ANP 含量は対象群 (133.5 $\pm$ 21.2nmol/g) に対して MMI 群 (117.9 $\pm$ 24.2nmol/g) は有意な変化を示さなかったが, T₄ 群では 79.9 $\pm$ 11.1nmol/g と有意な減少 (p<0.05) を示した。

Fig. 2 に脳内 ANP 含量の部位別の検討結果を示した。下垂体, 脳幹部, 中脳, 線状体, 大脳皮質では3群間に有意差を認めず, 視床下部 ANP 含量も対照群 (31.9 $\pm$ 1.9pmol/g) に対して T₄ 群は 33.0 $\pm$ 3.5pmol/g と有意な変化を示さなかったが, MMI 群では 17.5 $\pm$ 3.5pmol/g と有意な減少 (p<0.05) を示した。これら組織 ANP 含量と血中 T₄ 値との間に有意の相関は認められなかった。

測定を行なった血漿, 心房及び視床下部の ANP の免疫活性について, 逆相 HPLC を用いて

Fig. 1.

検討を行なった。Fig. 3(a) - (c) に示した様に、血漿および視床下部では主要な免疫活性は α -rat ANP に一致して認められたが視床下部の ANP 免疫活性の一部と心房内の ANP 免疫活性の大半は standard より疎水性の部位に溶出した。

Fig. 2.

Fig. 3.

考 察

甲状腺機能異常における血漿及び心房 ANP 濃度についての報告は既に幾つかあるが¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾²⁰⁾²⁴⁾, 我々の検討した範囲では視床下部 ANP についての報告はない。ANP が中枢神経系にもその受容体を有し特異な作用を有する事が報告されており¹⁵⁾¹⁶⁾, 甲状腺機能異常によって血漿および心房 ANP 含量のみならず視床下部でも変動を生ずる可能性が想定される。そこで, 今回我々は実験的甲状腺機能異常ラットを作成し脳内 ANP 含量に変動が生ずるか否かについて検討を行なった。

測定を行なった血漿, 心房及び視床下部中の ANP 免疫活性は, 逆相 HPLC にて α -rat ANP に一致するピークを認めた。しかし心房及び視床下部抽出中には, より疎水性の, おそらく前駆体である γ -rat ANP に相当すると考えられる分画が認められ従来の報告と一致する結果と考えられた²²⁾。

甲状腺機能亢進ラットにおける血漿 ANP 濃度は対照群に比して有意に高値を示し, 甲状腺機能低下ラットでは逆に有意な低値を示し, 従来の報告同様¹⁰⁾, 血中甲状腺ホルモン (T₄) 濃度に相関して変動する事が示された。又, 心房 ANP 含量は甲状腺機能低下ラットでは有意な変化を示さなかったが, 甲状腺機能亢進ラットでは有意な減少を示し, 血漿 ANP 濃度との結果および我々の甲状腺機能亢進症患者での尿中 ANP 免疫活性増加を認めた結果²⁰⁾とを合せ勘案すると, 甲状腺機能亢進状態では心房内の ANP が血中に多量に分泌された可能性が示唆された。この結果は Kohno らの報告¹⁰⁾とほぼ一致しており, 甲状腺ホルモンが何らかの機序で直接的に ANP 分泌を調節していると思われる。甲状腺ホルモンが直接 ANP 分泌を調節しているか否かについては Matsubara 等¹⁴⁾及び Argentin 等³⁾が培養心房細胞を用いて甲状腺ホルモンが直接 ANP あるいはその前駆体である Pro-natriodilatin mRNA を刺激する事を証明しており, 我々の結果を支持する結果と考えられる。今回の我々の検討では左右両心房を一緒に抽出して ANP 濃度の測定を行なったが, 最近の Ladenson らの報告¹²⁾では甲状腺ホルモンによる両心房の ANP 含量が左右別々に調節をうけているとしており, これが Hypothyroid の状態で Control との間に有意の変化を認めなかった原因の一つとも考えられた。

ANP が心房のみならず脳内の視床下部に高濃度に存在¹⁾し, 特に水, 電解質バランスの調節と実験的高血圧の発症に関係が深いとされる第3脳室前腹側部にその免疫活性含有細胞が多い事が報告されている¹⁸⁾。又, ANP の脳室内投与により飲水行動の抑制¹⁵⁾, 抗利尿ホルモン分泌抑制¹⁶⁾及び高血圧自然発症ラットの食塩嗜好性の抑制⁹⁾など, 神経ペプチドとして中枢作用を有する事が明らかとなっている。今回の我々の検討では, 甲状腺機能低下ラットにおいて視床下部 ANP 含量の有意な減少を認めた。しかし, 心房内 ANP とは異なり視床下部 ANP 含量と甲状腺ホルモンは有意な相関関係はなく, 甲状腺ホルモンが mRNA を介して直接的に ANP 分泌を調節しているのに対し, 視床下部では直接的よりもむしろ二次的な影響により変動するものと考えられた。いずれにしても, 甲状腺ホルモンの減少により視床下部 ANP 含量の変動を生ずるので, 脳内において ANP 代謝に甲状腺ホルモン関与が想定され更に甲状腺機能低下症での水, 電解質の調節異常の出現に ANP 含量の異常が関与している可能性も示唆された。

結 語

実験的甲状腺機能異常ラットにおける血漿, 心房及び視床下部 ANP 濃度の検討を行なった。

- 1) 血漿中の ANP 濃度は甲状腺機能亢進ラットでは有意な増加を示し, 甲状腺ホルモンの多寡

に応じて変動することが示された。

- 2) 甲状腺機能亢進ラットの心房内 ANP 含量は有意に低く、血漿 ANP 濃度の結果と合わせると、甲状腺機能亢進状態では心房より ANP が多量に血中に分泌された可能性が示唆された。
- 3) 甲状腺機能低下ラットの視床下部 ANP 含量は有意な低下を示し、甲状腺ホルモンが脳内 ANP 代謝に関与する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Anderson, J.V., Christofides, N.D., Suzuki, H., Polak, J.M. and Bloom, S.R.: The distribution of atrial natriuretic peptide immunoreactivity in rat brain. British Neuroendocrine Group, Inaugural Meeting p.1 (abstract), 1985.
- 2) Anderson, J.V., Raine, R.E.G., Proudler, A. and Bloom, S.R.: Effect of haemodialysis on plasma concentrations of atrial natriuretic peptide in adult patients with chronic renal failure. *J. Endocr.*, 110: 193-196, 1986.
- 3) Argentin, S., Drouin, J. and Nemer, M.: Thyroid hormone stimulates rat pro-natriodilatin mRNA levels in primary cardiocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 1336-1341, 1987.
- 4) Cusson, J.R., Gutkowska, J., Rey, E., Michon, N., Boucher, M. and Larochelle, P.: Plasma concentration of atrial natriuretic factor in normal pregnancy. *New Engl. J. Med.*, 313: 1230-1231, 1985.
- 5) De Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T. and Sonnenberg, H.: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rat. *Life Sci.*, 28: 89-94, 1981.
- 6) Garcia, R., Thibault, G., Cantin, M. and Genest, J.: Effect of a purified atrial natriuretic factor on rat and rabbit vascular strips and vascular beds. *Am. J. Physiol.*, 247: (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 1): 34-39, 1984.
- 7) Glowinski, J. and Iversen, L.L.: Regional studies of catecholamines in the brain. I. Disposition of 3-H-norepinephrine, 3-H-dopamine and 3-H DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.*, 13: 655-669, 1966.
- 8) Itoh, H., Nakao, K., Katsuura, G., Morii, N., Shiono, S., Sakamoto, M., Sugawara, A., Yamada, T., Saito, Y., Matsushita, A. and Imura, H.: Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, 59: 342-347, 1986.
- 9) Kangawa, K. and Matsuo, H.: Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118: 131-139, 1984.
- 10) Kohno, M., Takaori, T., Matsuura, T., Murakawa, K., Kanayama, Y. and Takeda, T.: Atrial natriuretic polypeptide in atria and plasma in experimental hyperthyroidism and hypothyroidism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134: 178-183, 1986.
- 11) Kohno, M., Matsuura, T., Yasunari, K., Yasuda, M., Takeda, T., Nishizawa, Y. and Morii, H.: Increased circulating atrial natriuretic peptide in patients with thyrotoxicosis. *Arch. Intern. Med.*, 146: 2077, 1986.
- 12) Ladenson, P.W., Bloch, K.D. and Seidman, J.G.: Modulation of atrial natriuretic factor by thyroid hormone: Messenger ribonucleic acid and peptide levels in hypothyroid, euthyroid and

- hyperthyroid rat atria and ventricles. *Endocrinology*, 123: 652-657, 1988.
- 13) Lang, R.E., Tholken, H., Ganten, D., Luft, F.C., Ruskoaho, H. and Unger, Th.: Atrial natriuretic factor-a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature*, 314: 264-266, 1985.
- 14) Matsubara, H., Hirata, Y., Yoshimi, H., Takatsu, S., Takagi, Y., Iida, T., Yamane, Y., Umeda, Y., Nishikawa, M. and Inada, M.: Effect of steroid and thyroid hormones on synthesis of atrial natriuretic peptide by cultured atrial myocytes of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145: 336-343, 1987.
- 15) Nakamura, M., Katsuura, G., Nakao, K. and Imura, H.: Antidiuretic action of α -human atrial natriuretic polypeptide administered intracerebroventricularly in rats. *Neurosci. Lett.*, 58: 1-6, 1985.
- 16) Obana, K., Naruse, M., Inagami, T., Brown, A.B., Naruse, K., Kurimoto, F., Sakurai, H., Demura, H. and Shizume, K.: Atrial natriuretic factor inhibits vasopressin secretion from rat posterior pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132: 1088-1094, 1985.
- 17) Shiono, S., Nakao, K., Morii, N., Yamada, T., Itoh, H., Sakamoto, M., Sugawara, A., Saito, Y. and Katsuura, G. and Imura, H.: Nature of atrial natriuretic polypeptide in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135: 728-734, 1986.
- 18) Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M., Eskay, R.L. and Zamir, N.: Distribution of atrial natriuretic factor-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Neuroscience*, 16: 917-948, 1985.
- 19) Sugawara, A., Nakao, K., Sakamoto, M., Morii, N., Yamada, T., Itoh, H., Shiono, S. and Imura, H.: Plasma concentration of atrial natriuretic polypeptide in essential hypertension. *Lancet II*: 1426-1427, 1985.
- 20) Suzuki, Y., Suzuki, H., Ohtake, R., Kobori, H., Tsuchiya, T., Hashigami, Y. and Shimoda, S.: Changes in the plasma and urine α -human atrial natriuretic peptide (α -hANP) concentrations in patients with thyroid disorders. *Endocrinol. Japon.*, 35:907-913, 1988.
- 21) Suzuki, Y., Ohtake, R., Kobori, H., Suzuki, H. and Shimoda, S.: A radioimmunoassay for α -human atrial natriuretic peptide in plasma and urine. *Dokkyo J. Med. Sci.*, 14: 127-133, 1987.
- 22) Tanaka, I., Misono, K.S. and Inagami, T.: Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: determination by specific radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124(2): 663-668, 1984.
- 23) Tikkanen, I., Fyhrquist, F., Metsarinne, K. and Leidenius, R.: Plasma atrial natriuretic peptide in cardiac disease and during infusion in healthy volunteers. *Lancet II*: 66-69, 1985.
- 24) Zimmerman, R.S., Gharib, H., Zimmerman, D., Heublein, D. and Burnett, J.C.Jr.: Atrial natriuretic peptide in hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64: 353-355, 1987.
- (受付日: '88. 9. 1)