原 著

ナトリウム利尿ペプチドファミリーのラット内耳での局在

鈴木 幹男・北西 剛・北野 博也
矢澤代四郎・北嶋 和智

Immunoreactivity of the Atrial Natriuretic Peptide Family in the Rat Inner Ear

Mikio Suzuki, Tsuyoshi Kitanishi, Hiroya Kitano,
Yoshiro Yazawa, Kazutomo Kitajima

Department of Otolaryngology, Shiga University of Medical Science

The atrial natriuretic peptide family (ANP family) is comprised of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP). These peptides regulate body fluid and blood pressure homeostasis as a neuropeptide in the central nervous system as well as a cardiac hormone in the periphery. To assess the possible physiological role of the ANP family, we investigated the immunohistochemical localization of these peptides in the rat inner ear. ANP-like and CNP-like immunoreactivities were observed in the spiral ligament just beneath the stria vascularis, spiral limbus, dark cell area, endolymphatic sac, spiral ganglion cells and vestibular ganglion cells. We could not detect specific BNP-like immunoreactivity in the inner ear. These observations were consistent with our previous study concerning the ANP family gene expression. The results suggest that the ANP family influences the metabolism of the inner ear fluid as well as afferent nerve activities in the inner ear.

Key words: ANP family, inner ear, immunohistochemistry, endolymph, perilymph, afferent nerve

はじめに

メニエール病は特発性内リンパ水腫を病理とする疾患であるが、内リンパ水腫形成の機序は未だ不明である。我々は内リンパ水腫形成要因として、ウイルス等による側頭骨の発育障害^{1)~3)}、自己免疫異常⁴⁾⁵⁾、内耳液代謝異常^{6)~8)}を想定し、基礎的、及び臨床的研究を続けている。近年、内耳液代謝のホルモン調節に関して、メニエール病

患者で血清抗利尿ホルモン（以下、ADH と略す）が高値であること⁹⁾¹⁰⁾、ADH リセプター阻害剤がメニエール病に有効であること¹¹⁾、内耳圧変化が ADH の分泌を調節している可能性が相次いで報告¹²⁾された。我々もラット内耳に ADH の V2 receptor の遺伝子発現があり、ADH が内耳液代謝に関与している可能性を報告している⁷⁾。ナトリウム利尿ペプチドファミリーは ANP (Atrial natriuretic peptide), BNP (Brain natriuretic peptide), CNP (C-type natriuretic peptide) の 3 種類のペプチドで構成され、主たる機能は生体に

おける水、電解質代謝の調節と考えられているが、多様な組織で分泌され機能調節を司っていることがわかってきた¹³⁾¹⁴⁾。ANP, BNP は主な産生部位はそれぞれ心房筋、心室筋で、血管拡張、ナトリウム利尿を促進する。一方、CNP は全身作用は前2者よりも軽微であるが、水電解質代謝や血管拡張、血管内皮増殖抑制などに働くと報告^{15)~17)}されている。さらに中枢神経系でもナトリウム利尿ペプチドファミリーが産生されることが確認されており、ニューロペプチドとして神経伝達、神経内分泌の調節、脳脊髄液産生の調節、グリア細胞の増殖抑制、神経-グリア間の水電解質代謝などに関与していると報告¹³⁾されている。また、中枢神経系でのナトリウム利尿ペプチドファミリーは視床下部ではレニン-アンジオテンシン系と拮抗し、ADH 分泌の抑制、プロラクチン分泌抑制を介して、中枢性に水電解質代謝を行っている。我々はナトリウム利尿ペプチドファミリーがレニン-アンジオテンシン系に拮抗することに着目し、内耳でも同様の拮抗作用が存在し、水電解質代謝に関与している可能性があると考え、RT-PCR を用いて、ラット内耳での遺伝子発現を検討した⁸⁾。この結果、内耳での ANP, CNP 産生、3 種類のナトリウム利尿ペプチドファミリーのリセプター (ANP-A (GC-A: ANP, BNP との結合能が高い), ANP-B (GC-B: CNP との結合能が高い), ANP-C (ANP, BNP, CNP のクリアランスリセプター) の存在が示唆された。

本論文ではこれら3種類のナトリウム利尿ペプチドファミリーが内耳のどの部位に存在するかを検討することにより、ナトリウム利尿ペプチドファミリーが内耳でどのように作用しているかを推察することにある。この目的のために、ANP, BNP, CNP に対する抗体を用い免疫組織化学の手法を用いて、ラット内耳での各ペプチドの局在を検討したので報告する。

方法及び結果

体重約 200 g の Wister ラット 20 匹を用いた。0.01 M リン酸緩衝食塩水 (以下、PBS と略す) にて灌流脱血の後、固定液 200 ml (0.1 M リン酸緩衝液 (以下、PB と略す), 4% パラフォルムアルデヒド, 0.2% ピクリン酸, 0.35% グルタルアルデヒド) にて灌流固定した。内耳を側頭骨と一体にして取り出し、中耳骨胞を除去し、上記の

固定液からグルタルアルデヒドを除いた固定液中で 24 時間 4°C で後固定した。15% シュクロース加 0.1 MPB で洗浄したのち、4% EDTA 加 0.1 MPB 中で脱灰を約 2 週間行った。脱灰後、10% ゼラチン加 0.1 MPB に包埋した。4% パラフォルムアルデヒドにてゼラチンを固定後、15% シュクロース加 0.1 MPB で洗浄した。標本を炭酸ガスにて凍結し、凍結標本をクライオスタットで 20 μ m の厚さに薄切した。薄切切片は浮遊法にて下記の反応を行った。まず、0.3% H_2O_2 で内因性ペルオキシダーゼを不活化した。10% 正常ブタ血清で非特異的反応をブロッキングのあと、1 次抗体 (1% ウシ血清アルブミンを含んだ 0.03% トリトン加 0.1 M PBS (以下、PBST と略す) にて 5000 倍に希釈) 中に 4°C 48 時間インキュベートした。PBST にて洗浄後、再び、10% 正常ヤギ血清で非特異的反応をブロックした。この後、2 次抗体 (ビオチン標識ヤギ抗ウサギ Ig G 抗体, Vectastain Co., USA, PBST にて 500 倍に希釈) に室温で 1 時間インキュベートした。PBST 洗浄後、ABC 溶液 (Vectastain Co., ABC-Elite, USA, PBST にて 4000 倍希釈) 中で 1 時間インキュベートした。PBST にて洗浄後、DAB-Ni (0.02% 3, 3' ジアミノベンチジン-4HCl, 0.07% 塩化ニッケル 6 水和物, 0.005% 過酸化水素水, 0.05 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.6) で 10 分間発色させた。なお、1 次抗体は兔抗ラット α -ANP 抗体、兔抗ラット BNP-45 抗体、兔抗ラット CNP-22 抗体 (Peninsula Lab, England) を用いた。免疫反応の特異性は、1 次抗体の代わりに、それぞれ ANP, BNP, CNP (ペプチド研究所, 日本) 4 μ g/ml 中にそれぞれの抗体を 5000 倍希釈し、4°C 24 時間反応させた抗体吸収液を用いて確認した。

結 果 (図 1~5, 表 1)

表 1 に免疫染色結果をまとめた。抗体吸収液を用いた染色で、染色反応が吸収されたものを陽性所見とし、吸収されなかった部位は非特異的反応と判定した。

1. ANP について

蝸牛ではラセン神経節、ラセン靱帯、ラセン板縁が染色された。ラセン靱帯は瀰漫性に染色され、また、ラセン靱帯・血管条の移行部がより強く染色された。抗体吸収液を用いた染色では、ラ

図1 蝸牛でのナトリウム利尿ペプチドファミリーの局在

いずれも横線は 200 μm を示す。

A : ANP の局在。ラセン靱帯 (▲), ラセン板縁 (★), ラセン神経節 (←) に陽性所見がみられた。
LIG: ラセン靱帯, SL: ラセン板縁, SG: ラセン神経節。

B : BNP の局在。蝸牛内に陽性所見を認めなかった。

C : CNP の局在。ラセン靱帯 (▲), ラセン板縁 (★), ラセン神経節 (←) に陽性所見がみられた。
LIG: ラセン靱帯, SL: ラセン板縁, SG: ラセン神経節。

図2 前庭神経節でのナトリウム利尿ペプチドファミリーの局在

いずれも横線は 100 μm を示す。

A : ANP の局在。前庭神経節細胞 (←) に陽性所見がみられた。

B : BNP の局在。前庭神経節内に陽性所見を認めなかった。

C : CNP の局在。前庭神経節細胞 (←) に陽性所見がみられた。

図 3 前庭（卵形嚢）でのナトリウム利尿ペプチドファミリーの局在

いずれも横線は 200 μm を示す。

A : ANP の局在。暗細胞部（←）に弱い陽性所見がみられた。感覚上皮下の染色像は抗体吸収液を用いた染色でも吸収されなかった。

B : BNP の局在。前庭内に陽性所見を認めなかった。

C : CNP の局在。暗細胞部（←）に弱い陽性所見がみられた。感覚上皮下の染色像は抗体吸収液を用いた染色でも吸収されなかった。

図 4 半規管でのナトリウム利尿ペプチドファミリーの局在

いずれも横線は 200 μm を示す。

A : ANP の局在。暗細胞部（←）に弱い陽性所見がみられた。感覚上皮下の染色像は抗体吸収液を用いた染色でも吸収されなかった。

B : BNP の局在。半規管に陽性所見を認めなかった。

C : CNP の局在。暗細胞部（←）に弱い陽性所見がみられた。感覚上皮下の染色像は抗体吸収液を用いた染色でも吸収されなかった。

図5 内リンパ嚢でのナトリウム利尿ペプチドファミリーの局在
いずれも横線は 200 μ m を示す。
A : ANP の局在。内リンパ嚢上皮 (←) に弱い陽性所見を認めた。
B : BNP の局在。内リンパ嚢に陽性所見を認めなかった。
C : CNP の局在。内リンパ嚢上皮 (←) に弱い陽性所見を認めた。

表1 ANP Family の内耳での局在

	ANP	BNP	CNP
蝸牛			
ラセン神経節	(+)	(-)	(+)
ラセン靱帯	(+)	(-)	(+)
ラセン板縁	(+)	(-)	(+)
コルチ器	(-)	(-)	(-)
前庭			
前庭神経節細胞	(+)	(-)	(+)
暗細胞部	(+)	(-)	(+)
感覚上皮	(-)	(-)	(-)
上皮下組織	(-)	(-)	(-)
内リンパ嚢上皮	(+)	(-)	(+)

セン靱帯の瀰漫性染色は減弱しなかったが、血管条直下のラセン靱帯の染色所見は吸収された。ラセン神経節では細胞質に陽性所見がみられたが、神経節細胞の軸索には陽性所見はみられなかった。ラセン板縁では線維細胞に瀰漫性に弱い陽性所見を認めた。コルチ器は外有毛細胞周囲が染色されたが、抗体吸収液で染色しても染色反応は消失せず、非特異的反応と判定した。

前庭では、半規管、球形嚢、卵形嚢の上皮下が瀰漫性に染色されたが、抗体吸収液を用いた染色

でも同様に染色され非特異的反応と判定した。前庭神経節細胞はラセン神経節と同様に細胞質に陽性所見を認めた。また暗細胞部、内リンパ嚢上皮は弱い陽性所見を示した。

2. BNP について

蝸牛ではラセン靱帯、前庭では半規管、球形嚢、卵形嚢の上皮下が瀰漫性に弱く染色されたが、抗体吸収液を用いた染色では、この所見は消失せず、非特異的反応と判定した。ラセン神経節、前庭神経節、内リンパ嚢上皮、暗細胞部に陽性所見を認めなかった。

3. CNP について

CNP は、ANP と同様の部位に陽性所見を認めた。ラセン靱帯の瀰漫性染色は ANP よりも弱く、抗体吸収液を用いた染色でも消失しなかった。ANP と同様に血管条直下のラセン靱帯が陽性所見を示した。前庭では、半規管、球形嚢、卵形嚢の上皮下が弱く瀰漫性に染色されたが、抗体吸収液を用いた染色でも同様に染色され非特異的反応と判定した。

考 察

1988年 Lamprecht ら¹⁸⁾ は内耳に ANP の受容

表2 内耳での ANP 局在に関する報告

	Meyer zum Gottesberge, et al (1991, 1995)	Yoon, et al (1992, 1994)	本研究(1998)
動物種	モルモット	S-D ラット	Wister ラット
1 次抗体	ウサギ抗ヒト α -ANP	ウサギ抗ラット α -ANP	ウサギ抗ラット α -ANP
陽性部位			
蝸牛			
ラセン靱帯	(+)	(+)	(+)
血管条	(+) : 毛細血管周囲	(-)	(+)
コルチ器	(+)	(+)	(-) : 吸収されず
ラセン神経節	(+)	(+)	(+)
前庭			
分泌部 (暗細胞部)	(-)	(?)	(+)
感覚上皮	(+) : 神経杯, 部分的 に吸収 (+)	(+) : 半規管神経杯	(-) : 吸収されず
内リンパ囊	(+)	(+)	(+)

体が存在することをオートラジオグラフィーを用いて初めて報告した。彼らは、ANP 結合部位が、蝸牛外側壁 (血管条, ラセン靱帯), 蝸牛軸, 前庭の分泌上皮にあると報告した。さらに, 免疫染色を用いて, ANP が内耳に存在することが報告^{19)~22)}され, ANP がオートクリンもしくはパラクリンの形をとり, 内耳で作用する可能性が提示された。表2に内耳における ANP 存在部位の報告をまとめた。報告者により, 動物種, 使用抗体がそれぞれ異なっているが, ラセン靱帯, ラセン神経節, 内リンパ囊ではいずれも陽性所見を報告している。ラセン靱帯, 内リンパ囊とも内外リンパ液の産生, 吸収に関与する部位であるから, ANP が内耳液代謝に関与する可能性が高いことを今回の研究でも確認できた。本研究ではラセン靱帯・血管条の移行部に陽性所見を認めたが, この部で ANP が産生されているとすると, 血管条の血管拡張, イオン透過性に影響を与え, 内リンパ液の産生にも関与する可能性も考えられる。また, 抗 ANP 抗体, 抗 CNP 抗体を用いた免疫染色では, ラセン神経節, 前庭神経節で神経節細胞が強く染色された。このことは神経ペプチドとして, 聴覚, 平衡覚の神経伝達に, ナトリウム利尿ペプチドファミリーが関与している可能性を示唆する。しかし, 聴覚, 平衡覚の伝達にどのような

影響を及ぼすのかは不明であり, 今後の検討課題と思われる。

ラセン靱帯, 暗細胞部, 内リンパ囊の ANP 産生細胞は血管と直接に接しておらず, 分泌された ANP は拡散によりオートクリンやパラクリンの形をとり近傍の細胞に働いていると思われる。これまで ANP の結合部位, リセプターの局在に関しては, 上述のように Lamprecht ら¹⁸⁾は蝸牛外側壁 (血管条, ラセン靱帯), 蝸牛軸, 前庭の分泌上皮にあると報告しているが, その後, Koch ら²³⁾はオートラジオグラフィーを用いて, 血管条に ANP 結合部位を検出している。彼らは更に, ANP 投与により血管条での cGMP 産生を証明しており, ANP の受容体が血管条にあり, かつ, ANP が作用していることを強く示唆している。また Meyer zum Gottesberge ら²²⁾はオートラジオグラフィーを用いて, 蝸牛外側壁, 血管条と卵形囊, 半規管膨大部の暗細胞部に結合部位があることを報告している。いずれも内耳液の産生部位にリセプターがあることを示しており, ANP が内耳液代謝に関係する可能性を示し, 今回の免疫染色の結果とも一致する。Furuta ら²⁴⁾は, RT-PCR を用い, ラセン靱帯とラセン神経節で ANP-A 受容体 (GC-A) の遺伝子発現を検出したが, 血管条では検出できなかったと

報告した。さらに, in situ hybridization 法では, 蝸牛神経の Oligodendrocyte に ANP-A 受容体の遺伝子発現を検出できたが, 内耳内には検出できなかったと報告している。我々⁶⁾, Krause ら²⁵⁾ も RT-PCR を用いて ANP-A 受容体の遺伝子発現が内耳にあることを確認し報告している。これまでの報告から ANP 受容体が内耳に存在することは, ほぼ確実と思われるが, これまでのオートラジオグラフィーを用いた研究結果と Furuta らの結果は大きく異なっており, ANP-A 受容体の局在についてはさらに検討が必要と思われる。

我々が文献を猟歩しえた範囲では, BNP, CNP に関して, その局在を検討した報告はこれまでなく, 本論文が最初と思われる。BNP は我々の RT-PCR を用いた検討と一致して内耳に反応を認めず, 内耳で産生されている可能性は低いと思われる。BNP は, ラットでは脳幹部を除く中枢神経系には存在しないとされており, 内耳でも同様と思われる。しかし, BNP の受容体である ANP-A 受容体の遺伝子発現が内耳で報告されていることから, 循環ホルモンとして内耳で作用する可能性は否定できない。CNP の免疫染色で陽性部位は, ANP とほぼ一致した。抗 ANP 抗体, 抗 CNP 抗体の特異性が問題となるが, それぞれの抗原で吸収すると免疫反応が消失するため, CNP の陽性所見は抗体の交差反応ではなく, 両者が同じもしくは近接する細胞に存在するためと推察される。

臨床的には Lamprecht ら²⁶⁾ は, メニエール病患者のグリセロールテスト中, 血中の ANP, cGMP が増加することを報告し, グリセロールテストでの聴力改善が ANP 増加により生じているのではないかと推論している。また児玉²⁷⁾ は聴力が変動するメニエール病例では ANP が有意に低値を示すことを報告している。これらの報告は, ヒトにおいてナトリウム利尿ペプチドファミリーが内耳に作用を及ぼし, 内耳機能を調節している可能性を示すものである。ラットを用いた我々の基礎的研究では, ANP, CNP は内耳内で産生され, 内耳内で作用し, BNP は循環ホルモンとして内耳で作用している可能性を示した。これまで報告されている臨床観察, 生理実験との間を詰めて行くことにより, ナトリウム利尿ペプチドファミリーが内耳で果たす役割やメニエール病をはじめ

とする内耳疾患への臨床応用について明らかにできると考える。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (N008671961) により行われた。

文 献

- 1) Yazawa Y, Kitahara M: Computerized tomography of the petrous bone in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 510: 67-72, 1994
- 2) Yazawa Y, Kitahara M: Computerized tomographic findings in endolymphatic sac surgery in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 510: 73-76, 1994
- 3) 矢澤代四郎, 鈴木幹男, 田中 寛, 他: 一側メニエール病の患側判定における内耳 CT 画像所見の役割. *Equilibrium Res* 55: 552-555, 1996
- 4) Suzuki M, Kitahara M: Immunologic abnormality in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 107: 57-62, 1992
- 5) Suzuki M, Krug MS, Cheng KC, et al: Antibodies against inner ear proteins in the sera of patients with inner ear diseases. *ORL* 59: 10-17, 1997
- 6) Suzuki M, Kitano H, Kitanishi T, et al: Detection of C-type natriuretic peptide (CNP) and atrial natriuretic peptide (ANP-B) receptor mRNAs in rat inner ear. *Neuroreport* 8: 439-443, 1997
- 7) Kitano H, Takeda T, Suzuki M, et al: Vasopressin and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear. *Neuroreport* 8: 2289-2292, 1997
- 8) Suzuki M, Kitano H, Kitanishi T, et al: RT-PCR analysis of mRNA expression of natriuretic peptide family and their receptors in rat inner ear. *Mol Brain Res* 55: 165-168, 1998
- 9) 石井正則, 白沢昭弘, 八代利伸, 他: メニエール病と ADH について. *Equilibrium Res* 50: 62, 1991
- 10) Takeda T, Kakigi A, Saito H: Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hy-

- drops. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 519 : 219-222, 1995
- 11) 石井正則, 吉田 茂, 八代利伸, 他: メニエール病に対する抗バゾプレシン作動薬の効果. *Equilibrium Res* 56: 124, 1997
- 12) Bartoli E, Satta A, Melis F, et al: Volume receptors in guinea pig labyrinth: relevance with respect to ADH and Na control. *Am J Physiol* 253 (3 Pt 2) : F341-346, 1989
- 13) Imura H, Nakao K, Itoh H: The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinology* 13: 217-249, 1992
- 14) Gerbes AL, Dagnino L, Nguyen T, et al: Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1307-1311, 1994
- 15) Shirakami G, Itoh H, Suga S, et al: Central action of C-type natriuretic peptide on vasopressin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* 159: 25-28, 1993
- 16) Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ: Human C-type natriuretic peptide: effects on the haemodynamic and endocrine response to angiotensin II. *Cardiovasc Res* 29: 108-111, 1995
- 17) Naruko T, Ueda M, van der Wal AC, et al: C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions. *Circulation* 94: 3103-3108, 1996
- 18) Lamprecht J, Meyer zum Gottesberge AM: The presence and localization of receptors for atrial natriuretic peptide in the inner ear of the guinea pig. *Arch Otorhinolaryngol* 245: 300-301, 1988
- 19) Meyer zum Gottesberge AM, Gagelmann M, Gorssmann WG: Atrial natriuretic peptide-like immunoreactive cells in the guinea pig inner ear. *Hear Res* 56: 86-92, 1991
- 20) Yoon YJ, Hellstrom S: Immunohistochemical localization of a-atrial natriuretic polypeptide in the rat cochlea. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 112: 604-610, 1992
- 21) Yoon YJ, Anniko M: Distribution of alpha-ANP in the cochlea and the vestibular organs. *ORL* 56: 73-77, 1994
- 22) Meyer zum Gottesberge AM, Schleicher A, Drummer C, et al: The volume protective natriuretic peptide system in the inner ear. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 520: 170-173, 1995
- 23) Koch T, Gloddek B, Gutzke S: Binding sites of atrial natriuretic peptide (ANP) in the mammalian cochlea and stimulation of cyclic GMP synthesis. *Hear Res* 63: 197-202, 1992
- 24) Furuta H, Mori N, Luo L, et al: Detection of mRNA encoding guanylate cyclase A/atrial natriuretic peptide receptor in the rat cochlea by competitive polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hear Res* 92: 78-84, 1995
- 25) Krause G, Meyer zum Gottesberge AM, Wolfram G, et al: Transcripts encoding three type of guanylyl-cyclase-coupled trans-membrane receptors in inner ear tissues of guinea pigs. *Hear Res* 110: 95-106, 1997
- 26) Lamprecht J, Plum J: Plasmaspiegel des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) nach oraler Glycerolbelastung. *Laryngol Rhinol Otol* 69: 31-34, 1990
- 27) 児玉 章: メニエール病患者の血漿 ANP 濃度. *Equilibrium Res* 51: 513-515, 1992

原稿到着: 平成10年9月2日
別刷請求先: 鈴木幹男
〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町
滋賀医科大学耳鼻咽喉科学教室
E-mail: miki@belle.shiga-med.ac.jp