



Title	Characterization of immunoreactive brain natriuretic peptide in human cardiac atrium
Author(s)	豊山, 仁根
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37532
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	堅	山	仁	根
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9405	号	
学位授与の日付	平成2年11月6日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Characterization of immunoreactive brain natriuretic peptide in human cardiac atrium (ヒト心房中における脳性ナトリウム利尿ペプチド免疫活性物質の特徴)			
論文審査委員	(主査) 教授	荻原俊男	(副査) 教授	宮井潔 教授 矢内原千鶴子

論文内容の要旨

[目的]

Brain natriuretic peptide (BNP) は、最初ブタ脳より単離・同定された新しいナトリウム利尿ペプチドで、Atrial natriuretic peptide (ANP) と類似した構造と薬理活性を有している。ブタBNPに続きヒトBNP前駆体構造がcDNA解析により決定され、そのC末端部にブタBNP-32と相同性の高いヒトBNP-32構造の存在することが明らかになった。また、BNP前駆体構造には哺乳類ANP類では見られない大きな種差の存在することが示された。本研究においては、このヒトBNP前駆体構造をもとにヒトBNPに特異的なRadioimmunoassay (RIA)を開発し、ヒト心房内におけるBNPの存在を明らかにするとともに、その分子型を解析することを目的とした。

[方法]

- (1) ヒトBNP抗血清は、ヒトBNP前駆体構造のC末端に相当する26残基のペプチドを化学合成し、これをカルボジミド法によりウシのサイログロブリンと結合させた後、Freund's complete adjuvantと乳化させたものを家兎に定期的に繰り返し免疫することにより調製した。
- (2) BNPのRIA法には、抗血清189-6を最終希釈42万倍で使用した。
- (3) ヒト心房は死後4時間以内の剖検時に採取し、抽出は組織を細断化後10倍量の水で95℃以上で10分間加熱、冷却後酢酸を1M、塩酸を20mMになるように加え、ポリトロンミキサーで4分間ホモナイズ後遠心分離し、その上清を心房抽出物とした。
- (4) 心房抽出物を純水で倍希釈後Sep-Pak C-18 cartridgeにより処理、ペプチド分画を

Sephadex G-50 ゲル濾過 (fine 1.8 × 134 cm, Pharmacia) により分離した後、各分画のBNP免疫活性をRIA法で測定した。更に、ゲル濾過でのBNP免疫活性画分を逆相高速液体クロマトグラフィー(逆相HPLC)により分析し、BNP免疫活性測定によりその分子型の同定を行なった。

[結 果]

- (1) 抗血清 189-6 を最終希釈42万倍で使用したRIA系において標準曲線の50%結合阻止量は2.6 fmol/tube, 測定範囲は0.2-30 fmol/tubeと高感度であった。また、本RIA系はヒトBNPに特異性が高く、既知のナトリウム利尿ペプチドとの交叉活性は0.003%以下であった。
- (2) 13人の心房(主に心耳)中のBNP濃度は9.98-59.32 pmol/gと個体差が大であり、平均では9.99 pmol/gであった。これらのANP濃度は1.63-35.56 nmol/g, 平均では13.69 nmol/gで、BNP濃度はANP濃度の約150分の1であった。
- (3) 心房抽出物をSephadex G-50 ゲル濾過により分離した結果、BNP免疫活性は15Kの高分子型と4Kの低分子型の2分子型に認めた。心房内の高分子型BNPと低分子型BNPの比は2:3-1:10で低分子型が主であった。
- (4) ゲル濾過による低分子型BNP免疫活性画分をC-18カラムを用いた逆相HPLCによりBNP免疫活性は単一なピークとして溶出され、これは合成ヒトBNP-32の溶出位置と一致し、低分子型BNPはBNP-32と考えられた。高分子型BNP免疫活性画分も同一の逆相HPLCにより単一なピークとして溶出され、高分子型BNPはr-BNPと考えられた。
- (5) 心房内の低分子型ANP免疫活性は α -hANPであり、高分子型ANP免疫活性は r -hANPであった。また中間型ANP免疫活性は β -hANPであった。

[総 括]

ヒトBNPは心房組織中に比較的高濃度で存在することが明らかとなった。そして、その組織濃度は、既報のブタのBNP濃度に相当し、ラットのBNP濃度の約6分の1であった。またヒトBNP濃度は個体差が大きく、疾患および病態との密接な関連が推察された。ヒトBNPもANPと同様に循環ホルモンとして機能し、体液・血圧などの調節により生体内ホメオスタシスの維持に働くと考えられる。しかし、心房中のBNP濃度はANP濃度の0.2-3.6%と低率で、両者間に明確な相関性が認められなかったことから、これら2種のナトリウム利尿ペプチドの産生および分泌は異なった機構により調節されると推察された。また、ヒト心房中BNPは低分子型BNP-32を主成分とし、高分子型 r -BNPとの2分子型の存在を確認した。これは r -BNPを主成分とするブタBNPおよびBNP-45を主成分とするラットBNPと異なり、3者のプロセッシング機構に種差の存在することが推察された。

論文審査の結果の要旨

本研究はヒトBNP前駆体構造をもとにヒトBNPに特徴的な Radioimmunoassay (RIA) 系を開発しヒト心房内におけるBNPの存在を明らかにするとともにその分子型を解析することを目的としたものである。この結果ヒト心房組織中にBNP免疫活性物質が平均 99.9 pmol/g で存在することが明らかとなった。また、心房内BNP免疫活性は 15K の高分子型と 4K の低分子型の 2 型を認め、その存在比は 2 : 3 ~ 1 : 10 で低分子型が主な存在型であることを明らかにした。

本研究は血圧体液調節ホルモンとして hANP に続きヒト心房より新しいナトリウム利尿ホルモンであるBNPを発見し、その存在を証明した。

本研究は今後生体の体液・血圧調節機構を解明する上において大きな意義を有し、学位の授与に値すると認める。