

正常およびネフローゼ・ラットの腎リソゾームにおける BNP の分解について

田中純子* 川嶋 朗*** 二瓶 宏*

Catabolism of brain natriuretic peptide(BNP) in normal and nephrotic rat kidney

Junko TANAKA*, Akira KAWASHIMA***, and Hiroshi NIHEI*

* Kidney Center, Department of Medicine, **Kidney Center, Division of Blood Purification, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

The major metabolic change that characterizes nephrotic syndrome (NS) is hypoalbuminemia. Edema, which is a well-recognized clinical feature, often results in disorder of peripheral circulation and congestive heart failure.

We previously reported that the albumin content of kidney lysosomal proteins was increased more than ten-fold in nephrotic rats compared to control rats, suggesting that kidney lysosomes play an important role in protein degradation in NS.

The present study was carried out to elucidate the role of catabolism of BNP, which is one of the functional protein-natriuretic peptides. We injected puromycin aminonucleoside(PAN) to induce the nephrotic rat state and isolated kidney lysosomes from normal and nephrotic rat kidney cortex by our methods. Immunoblot analysis of tricine-SDS polyacrylamide gel electrophoresis of rat kidney lysosomal proteins revealed the presence of an immuno-reactive peptide band, corresponding to the endogenous BNP. In addition, this was reduced as compared with the normal control. These results suggest that kidney lysosomes play an important role in BNP metabolism to maintain body fluid homeostasis and regulate blood pressure levels.

Jpn J Nephrol 2002 ; 44 : 439-446.

Key words : brain natriuretic peptide, catabolism, lysosome, nephrotic syndrome

緒 言

ネフローゼ症候群では、低アルブミン血症による膠質浸透圧の低下をきたし、浮腫が生じる。臨床においては、原疾患の治療のみならず浮腫のコントロールが困難なため、末梢循環不全や心不全をきたす例にもしばしば遭遇する。

元来、腎はアルブミンやペプチドを含むその他の蛋白質を分解し、血中蛋白質、ペプチドホルモン、アミノ酸の血中レベルを一定に保つことで体液の恒常性を維持している。われわれは以前、対照ラットおよびネフローゼ・ラットの腎および肝のアルブミン分解について検討した。その

結果、腎リソゾームにおけるアルブミン分解が対照ラットに比し著しく増大していた。さらに、対照ラットおよびネフローゼ・ラット両者において、腎リソゾームでのアルブミン分解が肝リソゾームに比し著増しており、腎リソゾームは正常状態においてもアルブミン分解の場として重要な役割を果たしていることが示唆された。その際、腎リソゾーム内にペプチドレベルと思われるいくつかの小分子蛋白も認められた。このため、今回われわれは、機能性蛋白質、特にナトリウム利尿ペプチドホルモン〔心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) や脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP), vasopressin〕の分解に着目した。今回は比較的明

瞭な結果の得られたBNPについて、対照ラットとネフローゼ・ラットにおいてその比較を行い、ネフローゼ症候群における浮腫形成、体液貯留に与える影響について考察した。

対象・方法

1. ネフローゼ・ラットの作成

体重約200gの雄Wistar rat 6匹に puromycin aminonucleoside (PAN) (SIGMA CHEMICAL CO. MO, USA) 10 mg/100g 体重を腹腔内に1回投与しネフローゼ・ラットを作成した³⁾。対照ラットに対しては、PAN溶液と同重量の生理食塩水を腹腔内投与した。ラットは代謝ケージで通常食下に飼育し、連日体重測定、24時間蓄尿、テストテープ(コンビスティックス/バイエル・三共)を用いた尿蛋白定性試験を行った。PAN注射後8日目(尿蛋白3+~4+)のラットにジエチルエーテル麻酔下に採血、腎摘出し、腎リソゾームの調整とリソゾーム内のBNPの分析を行った。血清の蛋白定量はビュレット法(総蛋白-HR II: Wako, 日立7170形自動分析装置: 日立製作所)、リソゾームの蛋白定量は bicinchoninic acid (BCA) protein reagent (Pierce, USA)⁴⁾を用いて定量し、尿の蛋白定量はピロガロールレッド法(マイクロTP-AR: Wako, 日立7170形自動分析装置: 日立製作所)を用いた。血清アルブミン定量はBCG法(アルブミン-HR II: Wako, 日立7170形自動分析装置: 日立製作所)、尿中のアルブミン定量はラジオイムノアッセイ法をそれぞれ用い、血清・尿中尿素窒素はウレアーゼ酵素法(デタミナーLUN: 協和メディックス, 日立7170形自動分析装置: 日立製作所)を用いて測定した。また血清クレアチニン、クレアチナーゼ・F-DAOS法(アスキュラオートCRE: シノテスト, 日立7600Dモジュール: 日立製作所)で、尿中クレアチニンはアルカリピクリン法(クレアチニン-HR: Wako, 日立7170形自動分析装置: 日立製作所)で測定し、血清・尿中のナトリウムとカリウムはイオン選択電極法(日立7170形自動分析装置: 日立製作所)を用いた。血中のANP(RIK 9103; PENINSULA LABORATORIES), BNP(RIK 9085; PENINSULA LABORATORIES)についてはラジオイムノアッセイ法を用いて測定した。

2. 腎リソゾームの調整

腎リソゾームは、川嶋らの方法を用いて4°Cの条件下で調整した^{1,2)}(Fig. 1)。尿定性試験で、尿蛋白が3+以上になった時点で、対照ラットおよびネフローゼ・ラットよ

Rat Kidney Cortex

Homogenize in 6 vol. of 0.3 M Sucrose containing Leupeptin under N₂ Gas

Homogenate

Centrifuge at 1000 rpm for 5 min.
2000 rpm for 5 min.

Postnuclear Supernatant

Incubate for 10 min at 37°C in the Presence of 2 mM Ca²⁺

Centrifuge in Percoll Gradient at 75600g for 15 min.

Lysosomes

Fig. 1. Procedure for purification of rat kidney lysosomes

り麻酔下に腎を摘出し、腎皮質の分離を行った。窒素ガスで飽和した0.3 M ショ糖溶液に Leupeptin (SIGMA CHEMICAL CO.) を 50 μg/ml の割合で添加し、はさみでミンチ状に刻んだ腎皮質に加えてポッター型ホモジナイザーにて(1,000 rpm, 6 ストローク)ホモジネートを作成した。その後ホモジネートを1,000 rpm 5分間、2,000 rpm 5分間の2回それぞれ遠心沈殿し、その核上清成分(postnuclear supernatant: PNS)に終濃度2 mMになるようにCa²⁺を加え⁵⁾、窒素ガスで飽和したのち37°C、10分間のインキュベーションを施行した。その後、開始密度1.23 g/mlとなるようにPercoll (amershan pharmacia biotech, NJ, USA)を懸濁した0.3 M ショ糖溶液(pH 7.4)に重層し、BECKMANJA-25.50ローターを用いて、75,600 g, 15分間冷却遠心沈殿した。さらに遠心沈殿管の底部より2.5 mlを吸引採取し、0.3 M ショ糖溶液を加え、15,000 rpm 10分間の遠心沈殿による洗浄を2回行いPercollを除去し、純度の高いリソゾームを得た。

3. 腎リソゾーム酵素測定法

調整したリソゾームの生化学的性質を、リソゾームのマーカー酵素として arylsulphatase^{6,7)}、ミトコンドリアのマーカー酵素として succinate-terazolium reductase⁸⁾を測定した。arylsulphataseは基質として p-nitro-catechol sulphate (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, USA) を、succinate-terazolium reductaseは基質として p-iodo-tetr-

azolium(Wako)を加え、それぞれ波長 515 nm, 490 nm の吸光度を測定して定量した。

4. Western blotting によるリソゾームの分析

1) リソゾームの調整

採取したリソゾームを、終濃度がそれぞれ 1.21% Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム), 4% 2-メルカプトエタノール(BIORAD, CA, USA)となるように調整し、分子量マーカーの Kaleidoscope Polypeptide Standards(BIORAD)とともに 100°C で 5 分間煮沸した。

2) tricine-SDS ポリアクリルアミドゲルの電気泳動および電気的転移

ゲルは 6×8 cm, 厚さ 1 mm で濃度 16.5% のポリアクリルアミドゲル(READY GEL J; BIORAD, CA, USA)を使用した。陰極側電極液には、Tris/Tricine/SDS 溶液(BIORAD, CA, USA)を、陽極側電極液には 0.2 M Tris-HCl 溶液(pH 8.9)を用い、1 コーム当たり 7.36 μg のリソゾーム蛋白を 150 V にて電気泳動を行った。その後ゲルを左右に二分し、一方は comassie brilliant blue で染色し、他方は PVDF 膜(MILLIPORE, MA, USA)にセミドライ法を用いて電氣的(2 mA/cm², 1 時間, 192 mM Glysin, 25 mM tris, 20% methanol)に転移させた。

3) 酵素抗体法とオートラジオグラフィ

リソゾーム内の BNP の証明は化学発光による検出法を用いて行った。PVDF 膜をブロッキング液(2.5% スキムミルク/PBS)にてブロッキングし、一次抗体液として抗 BNP 抗体液(Polyclonal antibody to Brain Natriuretic Peptide-rat(BNP); Biogenesis, England, UK; 1.6 μl/抗体液 500 μl: 0.1% BSA/TBST)と 18 時間反応させた後、洗浄液(0.5% Tween 20/TBS) 20 ml で 3 回洗浄した。次に二次抗体液(Peroxidase-conjugated, affinity-isolated goat anti rabbit immunoglobulins; DAKO, Denmark; 1 μl/2,000 μl: 0.1% BSA/TBST)と 1 時間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄した後、ECL(amershan pharmacia biotech, NJ, USA)を用いてオートラジオグラフィを施行した。

Table 1. Biochemical data of rats injected with PAN

	Control (n=6)	Nephrotic rat (n=6)	p value
Serum			
Total protein(g/dl)	5.3±0.1	4.5±0.3	NS
Alb(g/dl)	4.1±0.2	2.4±0.5	0.041
UN(mg/dl)	14.9±2.1	29.3±13.0	NS
Cr(mg/dl)	0.20±0.0	0.40±0.2	NS
ANP(pg/ml)	260.0±61.1	306.7±31.8	NS
BNP(pg/ml)	79.3±5.0	128.7±16.6	0.047
Urine			
Total protein (mg/day)	6.0±0.50	632.4±77.3	<0.001
albumin(mg/day)	0.026±0.0	346.0±42.9	0.0032
mean±SE			

結 果

1. 対照ラットおよびネフローゼ・ラットにおける生化学的検索

Table 1 に PAN 腹腔内注射後 8 日目のネフローゼ・ラットと、生理食塩水腹腔内投与後 7 日目の対照ラットにおける血清および尿の生化学検査と ANP, BNP 濃度を示した。Table 1 にみられるように尿中蛋白質およびアルブミンはネフローゼ・ラットでは対照ラットに比較して著明に増加し、反対に血清アルブミンは低下した。血清尿素窒素は有意に上昇していたが、血清クレアチニン濃度はごく軽度上昇のみであった。

血清 BNP 濃度はネフローゼ・ラットにおいて有意な上昇がみられた。血清 ANP はネフローゼ・ラットにおいて上昇していたが、両群間に有意差はみられなかった。

2. 単離したリソゾーム分画

Table 2 に単離したリソゾームにおける標的酵素である arylsulphatase の比活性および蛋白含量を示した。ホモジネイトの比活性を 1 とした場合、対照およびネフローゼ・ラットにおける腎リソゾームの相対比活性はそれぞれ

Table 2. Comparison of rat kidney lysosomes from control and nephrotic rat

	Arylsulphatase specific activity (units/mg/protein)		Relative specific activity (Lysosome/Homogenate)	Yield (%)
	Homogenate	Lysosome		
Control	0.011	0.155	14.1	0.270
Nephrotic rat	0.006	0.120	20.0	0.184

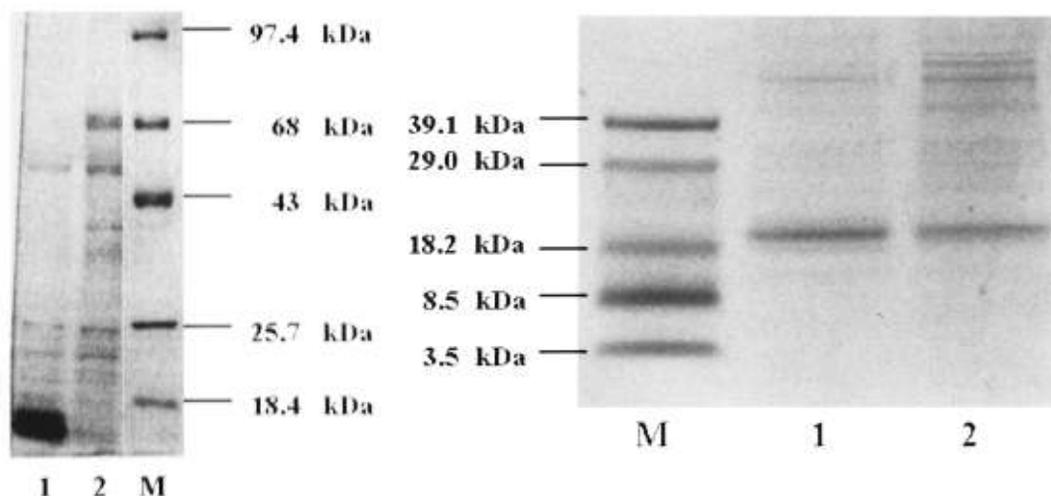


Fig. 2.

M : Molecular weight marker. 1 : Control rat kidney, 2 : Nephrotic rat kidney

a : SDS-PAGE of lysosomal proteins.

In nephrotic rat, the pattern of SDS-PAGE of lysosomal proteins is different from control rat.

b : Tricine SDS-PAGE of lysosomal proteins.

In comparison with control rat, there are some bands of lower molecular weight just like peptides in nephrotic rat as well as other higher molecular weight proteins.

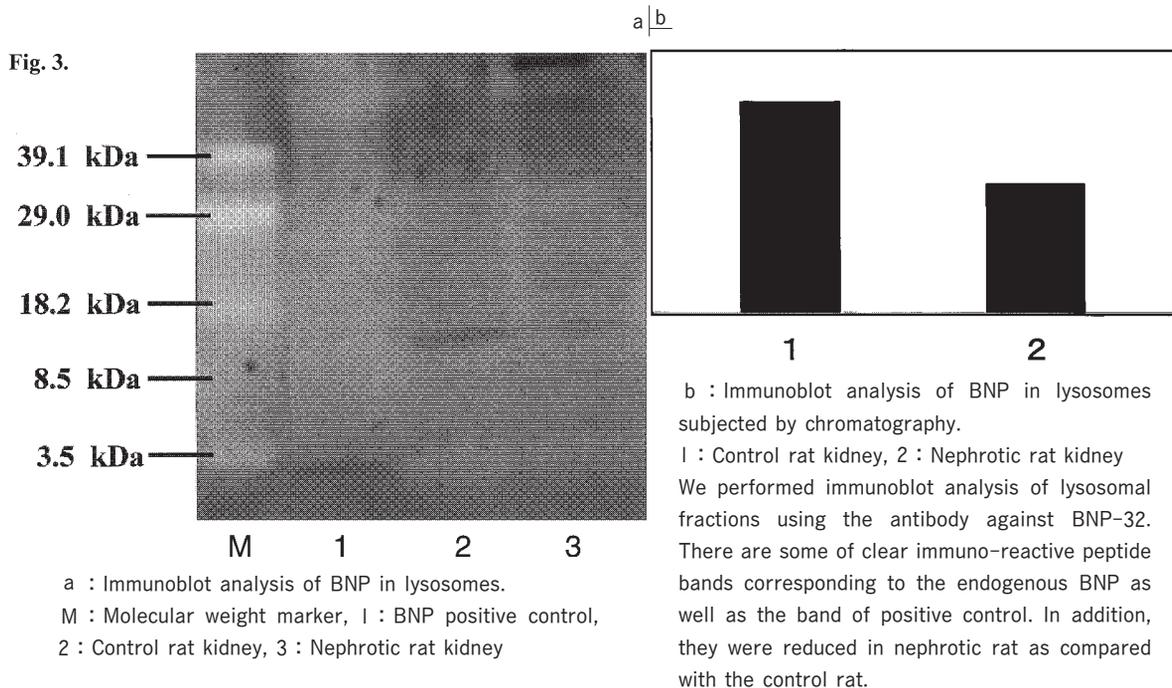
14.1, 20.0であった。ミトコンドリアの標識酵素である succinate-terazolium reductase の活性は検出されなかった。

3. Western blotting によるリソゾーム内 BNP の分析

対照およびネフローゼ・ラットの腎リソゾームの分析を行った。Fig. 2a は、対照およびネフローゼ・ラットの腎リソゾームを調整し、泳動する蛋白量を同量にして SDS-PAGE を行い、comassie brilliant blue で染色したものである。1 が対照ラットの腎リソゾーム、2 がネフローゼ・ラットの腎リソゾーム、M は分子量マーカである。ネフローゼ・ラットでは正常に比し蛋白質のパターンが大きく異なり、アルブミンを主としたより大きい蛋白が取り込まれていた。反対にネフローゼ・ラットにおける小分子の蛋白は、対照ラットより減少していたが、ペプチドレベルと思われるいくつかの鮮明なバンドが存在した。つまり、腎リソゾームは、尿蛋白の有無あるいはその性質や量に依存してパターンが変わるということを示したもので、したがって、機能性ペプチドにおいても違いが生じるのではないかと仮定した。また、同量の蛋白をのせたときの蛋白の泳動パターンが違うということは、リソゾームに内在する蛋白やペプチドが量的、質的にも異なるので、今回の実験には細胞内内在性蛋白自体をおくことができないと考え用いなかった。Fig. 2b は、ペプチド分析のために施行した 16.5% の tricine SDS-PAGE である。ペプチドレベルでも、ネフローゼ・ラットは対照ラットに比べ大きい分子量

のバンドが目立ったが、18.2 kDa 以下のレベルでもいくつかの鮮明なバンドが認められた。ここで、機能性ペプチドでありかつ体液異常の状態にて深い関連があると思われるナトリウム利尿ホルモン (ANP や BNP, vasopressin) の存在に着目した。腎リソゾームにおけるこれらの代謝について考察するため、各ナトリウム利尿ホルモンの抗体を用いて immunoblotting を行うことにした。

Fig. 3a は対照およびネフローゼ・ラットの腎リソゾームを調製し、tricine-SDS-PAGE を行った後、抗 BNP 抗体を用いて immunoblotting で分析したものである。M は分子量マーカ、1 は BNP のポジティブ・コントロール、2, 3 はそれぞれ対照ラットおよびネフローゼ・ラットの腎リソゾームである。ポジティブ・コントロールには BNP-32 (FW=3435) を用いた。2, 3 ともに分子量 12 kDa 付近のバンドが見られたが、それ以外にも数本のバンドが認められた。さらに、ネフローゼ・ラットにおけるバンドは、対照ラットにおける同様の分子量のバンドに比し減少していた。このため、各バンドについてクロマトスキャナーによるスキャニングを行ったが、いずれも同様の結果であった。Fig. 3b では、最も明確なバンド (分子量が約 12 kDa) について半定量評価を行ったものを呈示した。これらは、今回扱ったラットの全例について観察し、同様の結果が得られた。また、BNP と同様に体液調節に重要な役割を持つと思われる ANP, vasopressin についても同様の実験を



行ったが、明瞭なバンドは検出されなかった。

考 察

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、ヒトおよびラット心房から単離同定された ANP⁹⁾、ブタ脳から単離された BNP¹⁰⁾、さらに同じくブタ脳より発見された C タイプ ナトリウム利尿ペプチド (CNP)¹¹⁾ から構成される¹²⁾。ANP は主に心房から産生、分泌されるのに対し、BNP は心室から産生、分泌されており^{13,14)}、ANP、BNP の薬理作用としては、直接的血管弛緩作用や用量依存的に糸球体濾過量や腎血漿流量を増加させ、尿量、ナトリウム排泄を増加させることが知られている¹²⁾。両者とも、心不全患者における血中濃度が上昇していることから¹⁵⁾、心不全の病態に深く関与していることが推察されており、心不全のスクリーニングや左室駆出率低下の検出に用いられている^{16,17)}。なかでも BNP は、その検出能力が C 末端 ANP や N 末端 ANP に比し優れていることが示され、その臨床的有用性が期待されている^{18,19)}。

しかしながら、その代謝のメカニズムはいまだ不明な点が多い。現時点においては、腎臓、ナトリウム受容体 NPR-A/NPR-B への結合、クリアランス受容体 NPR-C による代謝を受けることが知られている^{12,20)}。さらに、腎臓の近位尿細管刷子縁には多量の中性エンドペプチダーゼ (NEP) が存在しており、ナトリウム利尿ペプチドを分解

することが報告されている^{21~24)}。これに対し、蛋白質の多くは腎の近位尿細管で再吸収され、蛋白分解酵素を有するリソゾームに取り込まれることが解明されている。

われわれは、以前、ネフローゼ・ラットの腎リソゾームを分析し、ネフローゼ症候群における低アルブミン血症の原因として、腎からのアルブミン喪失のみならず、腎リソゾームにおけるアルブミン分解が正常でのそれに比し著しく増大していることを指摘した。加えて、対照ラットにおける腎リソゾームでのアルブミン分解が肝リソゾームでのそれに比して約 10 倍認められ、腎リソゾームは正常状態においてもアルブミン分解の場として重要な役割を果たしていることが示唆された¹⁾。その際、腎リソゾーム内にペプチドレベルと思われるいくつかの蛋白も認められた。このため、われわれは機能性ペプチド、特に体液異常の病態に深い関連があると思われるナトリウム利尿ペプチドホルモン (ANP や BNP, vasopressin) の分解に着目し、これらの代謝においても腎リソゾームが深く関与しているのではないかと推察した。対照ラットと PAN によるネフローゼ・ラットにおいてその比較を行い、ネフローゼ症候群における浮腫形成・体液貯留に与える影響について考察した。

われわれの方法²⁾を用いて腎皮質より調整し、純度の高いリソゾームを得た。今回目的とする BNP は分子量が 5,000 Da 前後と小さく、通常の SDS-PAGE では検出されない。このため、16.5%濃度の tricine-ポリアクリルアミドゲルを用いて抽出した腎リソゾームの tricine-SDS-

PAGE を行った。さらに電氣的転移を行った後、抗 BNP 抗体を用いた immunoblotting にて分析を行った。その結果、ポジティブ・コントロールにおいては分子量 3.2 kDa 付近に明瞭なバンドが認められ、対照ラット、ネフローゼ・ラットにおいてもポジティブ・コントロール同様に BNP と immuno-reactive な明瞭なバンドが数本認められた。このことより、BNP は NSE による分解のみならず、他の多くの蛋白質と同様に腎の近位尿細管においてリソゾームによる分解が行われていることが示唆された。さらに、BNP の分子量は通常 5,000 Da 程度といわれているが、ポジティブコントロールのバンドが分子量 3,000 Da 程度に出現してくる理由としては、コントロールの BNP 自体が分子量が 3,453 Da と小さいため、実際のリソゾーム内の BNP とはバンドの高さに多少の差異が生じうると考えた。また、分子量 3,200~5,000 Da 付近以外にも、対照ラット、ネフローゼ・ラットともにバンドが複数見られたことについては以下のように考察した。

Matsuo らは、血漿中には BNP-32, pro-BNP (MW=12 kDa) の 2 種類の BNP が存在し、血漿中では後者が主であると報告している²⁵⁾。今回の検討では、対照ラット、ネフローゼ・ラットともに分子量 12 kDa 付近のバンドが最も鮮明で、その下にも数本のバンドが見られた。この 12 kDa 付近のバンドは、分子量が一致すること、抗 BNP 抗体に immuno-reactive であることなどより、pro-BNP であると考えた。また、他の数本のバンドについては、リソゾーム内には多くの酵素が存在するため、リソゾーム内に取り込まれた BNP はリソゾーム内で分解されると考えられるため、BNP の分解中間産物であると推察した。さらに Matsuo らの報告を考慮すると、血漿中からリソゾーム内へ pro-BNP (MW=12 kDa) 優勢の BNP が移行し、リソゾーム内で処理されている段階をみたものであり、血漿中と同様に pro-BNP と思われるバンドが最も鮮明であるのは、pro-BNP を処理する酵素が律速酵素であると考えた。

また、興味深いことに、ネフローゼ・ラットでは対照ラットと比較し血中の BNP 濃度は有意に上昇していたにも関わらず、検出されたバンドは対照ラットのものより薄くかつ細いものであった。Fig. 3b に示した通り、最も鮮明であった 12 kDa のバンドについて半定量評価も行ったがそれは明らかであった。このことは、ネフローゼ・ラットが対照ラットに比べ、BNP の分解が低下している可能性が十分に示唆されるのではないかと考えた。

リソゾーム内の蛋白質が多いものほど代謝が亢進していることは、われわれの過去の検討²⁾でも説明されるが、リソ

ゾーム内の蛋白質が少ない場合は、リソゾーム内への取り込み自体の低下による影響も可能性として否定はできない。すなわち、リソゾームに取り込まれる以前に、他の BNP の分解を担う機構の存在も想定しうる。しかし、前述の NEP による処理の定量化は現時点では困難であり、BNP 代謝におけるリソゾームと NEP それぞれの貢献度の評価は今後の課題として残る。あえて述べるならば、NEP は ANP よりも CNP に強い親和性を有し、BNP に対する親和性は他のナトリウムペプチドよりも低いことが指摘されている¹²⁾。ワンショット静注後の血中半減期は ANP で約 1.7 分、BNP で 2 分強程度とほとんど差がみられず、BNP に関しては NEP 以外の他の代謝経路の影響が大きいのではないかということは想定できるであろう。このため、BNP の分解処理において、他の蛋白質と同様にリソゾームも一部関与しているのではないかという想定のもとに今回の実験を行った。ほかに血中のプロテアーゼの関与も考慮したが、生体内において他の蛋白分解酵素に比し極微量であることや、プロテアーゼインヒビターの存在などを考えると大きな影響はないと考えた。また、肝リソゾームの関与については、われわれの以前の研究より、ネフローゼの状態での蛋白分解は、肝臓に比し圧倒的に腎臓での処理が主体であることが示されている。また、リソゾームの関与が小さい場合、endopeptidase で処理されるのが一般的であるが、対照ラットでの検討の結果より、BNP の分解にもリソゾームが関与していることが考えられ、PAN によるネフローゼ・ラットにおいて同様の検討を行った。

ネフローゼ症候群における血中の BNP 濃度が有意に高値であることの理由としては、われわれは以下のことを推察した。ネフローゼ症候群では相対的体液量過剰状態となり、心室容量増加をきたすことにより心室壁が伸展し、BNP 分泌が促進されると考えられる²⁶⁾。BNP は腎に作用した後、同部位で代謝されるが、その半減期は約 2 分程度といわれており²⁷⁾、通常は比較的速やかに代謝される。しかし、BNP は心室筋細胞で合成された後はリザーバーが存在せず、直接的に血漿に放出されると推察され、一時的もしくは急激な負荷の軽減および解除はすぐに蛋白新合成として反映されないため、分泌が継続されやすいとも考えられる^{28,29)}。以前の検討にて、ネフローゼ状態ではリソゾームにおけるアルブミンの分解が亢進していたため、ネフローゼ状態における BNP の代謝も同様に、リソゾームでの代謝が亢進していると想定していたが、それに反して BNP の代謝は低下しており、アルブミン分解とは逆の結果であった。ネフローゼの状態でもすべての蛋白の分解が

一様に亢進するわけではないということが示され、非常に興味深かった。

今回の実験で、ネフローゼ・ラットにおいてBNPの分解が抑制されていることが強く示唆された。これより、ネフローゼ症候群では腎リソゾームにおける分解を制限するなんらかの調節機構が存在し、上昇した血中のBNP濃度を維持することによって尿量を確保し、体液の恒常性を保とうとしていることが推察された。

今回のわれわれの研究は、BNPの分解場所を明らかにし、その代謝のメカニズムとネフローゼ症候群における体液バランスの調節の解明に非常に有益であったと考える。しかし、ここで留意すべき点は、PANラットは実験モデルの一つで、ネフローゼ症候群の一面を捉えることができる腎症であり、今回の検討では、その一部を考察したにすぎない。

今後、ネフローゼ症候群の体液貯留状態における詳細な分析が求められるとともに、ステロイドなどの治療著効例と抵抗症例との差異の検討や治療への応用、BNP以外の機能的蛋白との比較検討などが、課題であると考えられる。

文 献

- 川嶋 朗. ネフローゼ・ラットの腎リソゾームにおけるアルブミン分解について. 日腎会誌 1990; 27: 161-9.
- Kawashima A, Sato A, Kawashima M, Nitta K, Yumura W, Sugino N, Nihei H, Natori Y. A Simple procedure for the isolation of rat kidney lysosomes. *Kidney Int* 1998; 54: 275-8.
- Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephritis. *Kidney Int* 1975; 8: 219-32.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
- Lehninger AL. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1959; 234: 2465-70.
- Milson DW, Rose FA, Dodgson KS. The specific assay of arylsulphatase C, a rat liver microsomal marker enzyme. *Biochem J* 1972; 128: 331-6.
- Roy AB. The sulphatase of Ox liver. *Biochem J* 1960; 77: 380-6.
- Penington RJ. Biochemistry of dystrophic muscle. Mitochondrial succinic-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase. *Biochem J* 1961; 80: 649-54.
- Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 131-9.
- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78-81.
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 863-70.
- Martin RW, Juliana R, Blesley AB. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 1997; 349: 1307-10.
- Saito Y, Nakao K, Itoh H, Yamada T, Mukoyama T, Arai H, Hosoda K, Shirakami G, Suga S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Imura H. Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 360-8.
- Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jogasaki M, Imura H. Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* 1990; 335: 801.
- Lang CC, Choy AMJ, Struthers AD. Atrial and brain natriuretic peptides: a dual natriuretic peptide system potentiating involved in circulatory homeostasis. *Clin Sci* 1992; 83: 519-27.
- Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VVS, Caidahl K, Lie RT, Nilsen DWT, Sundsfjord JA, Dickstein K. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. *Circulation* 1996; 93: 1963-9.
- Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. Attenuation of compensation of endogeneous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure. *Circulation* 1997; 96: 509-16.
- Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, Coats AJS, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Sutton GC. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet* 1997; 350: 1349-53.
- Yamamoto K, Burnett JC, Jougasaki M, Nishimura RA, Bailey KR, Saito Y, Nakao K, Redfield MM. Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1996; 28: 988-94.
- Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86: 1081-8.
- Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 479-602.
- Olins GM, Spear KL, Siegel NR, Zurcher-Neely HA. Inactivation of atrial natriuretic factor by the renal brush border. *Biochem Biophys Acta* 1987; 901: 97-100.
- Sonnenberg JL, Sakane Y, Jeng AY, Koehn JA, Ansell JA, Wennogle LP, Ghai RD. Identification of protease 3. 4. 24.

- 11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides* 1988 ; 9 : 173-80.
24. Erdös EG, Skidgel RA. Neutral endopeptidase 24. 11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 1989 ; 3 : 145-51.
25. Tateyama H, Hino J, Minamino N, Kangawa K, Minamino T, Sakai K, Ogihara T, Matsuo H. Concentrations and molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 185 : 760-7.
26. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in human—evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 1402-12.
27. 原田昌樹, 齋藤能彦. ANP, BNP の基礎. 木之下正彦, 小川研一(編)BNP と日常臨床. 東京:南江堂, 1999:1-12.
28. Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Suga S, Jougasaki M, Imura H. Natriuretic peptide as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Cir Res* 1991 ; 69 : 491-500.
29. 田中純子, 川嶋 朗, 新田孝作, 湯村和子, 二瓶 宏. 糖尿病性腎症による血液透析患者における血漿 BNP 濃度と心機能に関する検討. *東女医大誌* 2000 ; 70 : 13-8.