

## ニューロンレベルでみたバゾプレッシン産生、 分泌のダイナミズム

天谷文昌

大津市民病院救急集中治療部（現・京都府立医科大学麻酔学教室・集中治療部）

**Key Words:** vasopressin, shock, hypothalamus, histochemistry, rat

### 【要旨】

形態学的手法によって長期分泌刺激時のバゾプレッシン合成、分泌の動態を調査した。一週間の脱水刺激の後、合成の指標としてmRNA、細胞内ストアの指標としてペプチドを組織化学的に検出、個々の細胞における両者の発現を比較した。mRNAとペプチドの解離は脱水刺激時には全体の40%に達した。特にmRNA陽性、ペプチド陰性ニューロン数の増加は顕著であり、細胞内ストアの枯渇が分泌不全の本態であることが示された。

### 【はじめに】

バゾプレッシン (Vasopressin, VP) は抗利尿作用と同時に強力な血管収縮作用を有する。正常な循環動態下ではVPの血圧上昇作用は軽度であるが、循環不全時の血圧維持には大きな影響を持つといわれる<sup>1,2)</sup>。出血性ショック、敗血症性ショックなどにおける血中VP濃度はその初期には血圧低下に反応して著しく上昇するが、ショックが遷延化するにつれ徐々に低下する<sup>3,4)</sup>。循環不全が長期化するとカテコールアミンなど昇圧剤の効果は減弱するが、VP投与はカテコールアミン抵抗性の低血圧に効果であるといわれる<sup>5,6)</sup>。

VPはペプチドホルモンであり、視床下部の室傍核および視索上核でmRNAの情報をもとに合成される。合成されたVPは一時的に細胞内に貯蔵されたのち、軸索を介して下垂体後葉まで輸送され血中に分泌される。VP合成にはVP mRNA発現が必須であることから、mRNAが存在するニューロンではVP合成が行なわれていると考えることができる。また、VPペプチドの存在は、そのニューロンにVPが貯蔵されていることを示す。したがって、形態学的にmRNAおよびペプチド発現をニューロン上に検索することで、それぞれのニューロンでのVP合成、分泌の動態を解析することが可能となる。

われわれは、循環不全遷延期には長期間のVP分泌刺激のためにその合成、分泌のバランス

が崩壊、VP分泌不全を生じることで血中VP濃度が低下するのではないかと考えた。この仮説を証明するため脱水刺激を与えたラットを用いてVP mRNA、ペプチドの発現変化を個々のニューロンレベルで形態学的に検索し、分泌刺激下のVP合成、分泌の動態変化を解析した。

### 【方法】

雄性SDラット (200-250g) を実験に用いた。慢性脱水 (DEHYD; n=5) 群のラットは2%NaCl含有水を飲料水として投与しながら7日間飼育した。コントロール (CONT; n=5) 群には通常の水を投与した。4%パラホルムアルデヒドを用いて両群ラットを深麻酔下に灌流固定し、視床下部を含む脳組織を摘出した。摘出脳よりクライオスタットを用いて30 $\mu$ mの組織切片を作成した。作成した切片に抗VP抗体 (Peninsula 1: 1000) を反応させ、ビオチン化2次抗体 (Sigma, 1:1000) と反応したのち、Avidin-biotin反応をへてジアミノベンジンでVPペプチドを可視化した。免疫反応終了後<sup>35</sup>S-CTPで標識したVP mRNAのプロープを用いてin situ hybridization法をおこなった<sup>7)</sup>。プロープはVP cDNAを基にSP6 RNAポリメラーゼを用いて作成した。室傍核全体のVP mRNA発現量をイメージアナライザBAS2000 (Fuji Film Co.) で定量化したの

ちVP mRNAを可視化し、顕微鏡下での観察をおこなった。視床下部室傍核大細胞性領域で解析を行い、VPの発現パターンによって1) mRNA陽性、ペプチド陽性、2) mRNA陽性、ペプチド陰性3) mRNA陰性、ペプチド陽性の3群にわけてそれぞれに属するニューロン数を計測し全VPニューロンに対する割合を計算した。t-testによって統計学的解析をおこない、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

【結果】

視床下部全体のVP mRNA発現量はDEHYD群で有意に増加した(図1)。視床下部室傍核でのVP mRNA、ペプチドの発現および脱水刺激後の変化を図2に、室傍核VPニューロンにおいてmRNA、ペプチド発現パターンで分類した3群の全体に対する割合の変化を図3に示す。図2において、mRNAは黒色粒子として検出され、ペプチドは細胞体全体の染色として認められる。図2Cに示すとおり、VPニューロンはmRNA、ペプチドの発現パターンによって1) mRNA陽性、ペプチド陽性、2) mRNA陽性、ペプチド陰性3) mRNA陰性、ペプチド陽性の3種のニューロン群に分類することができた。CONT群では全体の80%程度のニューロンでmRNAとペプチドの発現が一致したが、一部ニューロンでは発現に解離が認められた(図2A、図3)。DEHYD群では発現の解離は拡大傾向となり、特にmRNA陽性、ペプチド陰性ニューロンの割合が有意に増加した(図2B、図3)。

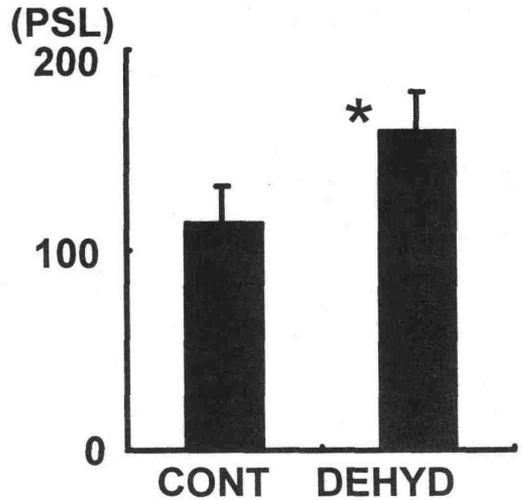


Fig. 1 室傍核全体におけるVP mRNA量の変化。慢性脱水群において発現量の有意な増加を認める。\*:  $p < 0.05$  VS CONT。

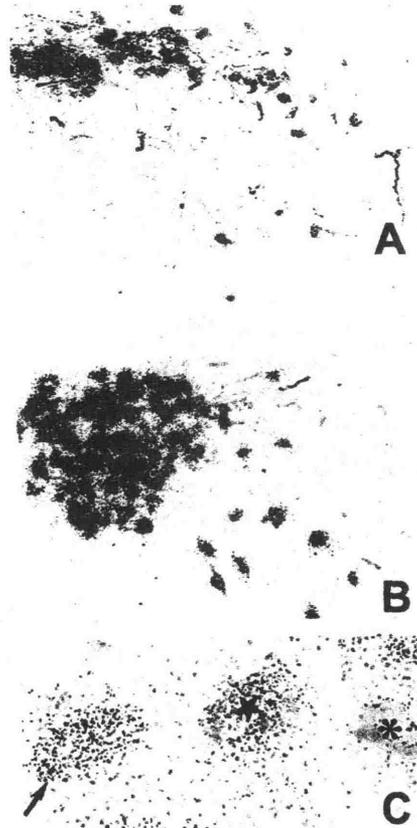


Fig. 2 コントロール群(A)、慢性脱水群(B)における室傍核VP mRNAおよびペプチド発現。Cに強拡大所見を示す。VPニューロンはmRNAおよびペプチド発現の有無により1) mRNA陽性、ペプチド陽性(星印)、2) mRNA陽性、ペプチド陰性(矢印)、3) mRNA陰性、ペプチド陽性(アスタリスク)の3群に分類された。

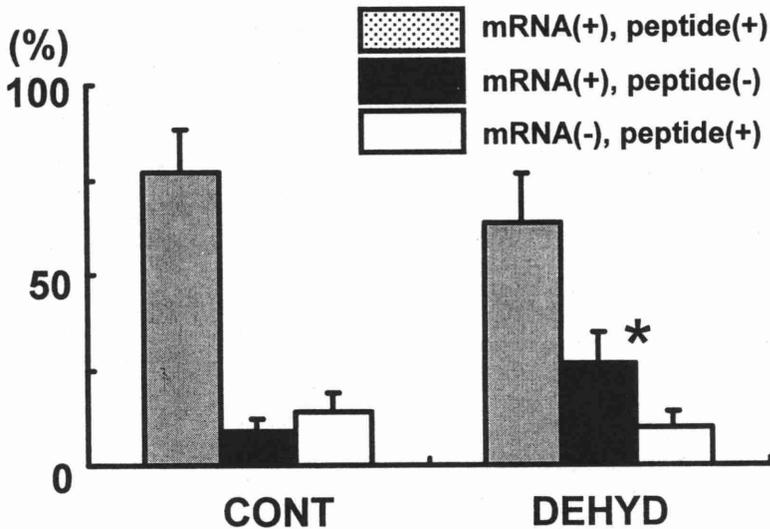


Fig. 3 VP mRNA、ペプチド発現パターンの変化。慢性脱水群では両者を発現するニューロン数が減少し、mRNAのみを発現するニューロンの割合が有意に増加した。\*:  $p < 0.05$  VS CONT。

【考察】

脱水刺激によって視床下部全体の VP mRNA量は増加し<sup>8)</sup>、ペプチド量は減少する<sup>9)</sup>。また、循環不全慢性期には下垂体後葉のVP含有量は低下するといわれる<sup>10)</sup>。これらの報告から、VP分泌刺激が長期化すると、その原因にかかわらず視床下部、下垂体のVP合成、分泌、貯蔵に変化が生じることは明らかである。今回われわれはmRNAとペプチドの同時検出によってVPの合成と分泌のバランスを検討した。われわれが得た結果から、脱水モデルでは視床下部VPの合成、分泌のバランスは崩壊することがVP分泌不全の原因となっていることが明らかとなった。

室傍核VPニューロンはmRNAとペプチドの発現の組合せによって3種類に分類することができた。mRNAとペプチドの両者を発現するニューロンは、現在VPを合成しつつあり、かつ十分なVP貯蔵をもつものと考えられる。mRNA陽性、ペプチド陰性ニューロンはVP合成が行なわれていても、それを上回る分泌量のために結果として細胞内貯蔵が欠乏していることを示す。mRNA陰性、ペプチド陽性のニューロンはVPの細胞内貯留はあるが、何らかの原因によってVP合成が中断している状態

にあると思われる。このようなmRNAおよびペプチド発現の多様性はコントロールのラットでも認められ、VP合成、分泌のバランスはたとえ無刺激であっても個々の細胞によってさまざまに異なることが明らかとなった。また、各群のニューロン数は刺激によって大きく変化したが、このことはVP合成、分泌が各ニューロンによってきわめて動的に制御されていることを示唆すると考えられる。

脱水刺激を与えた後、mRNAとペプチドの発現の解離はより顕著となった。とくにmRNA陽性、ペプチド陰性のニューロンの割合は有意に増加し、分泌需要の増加に伴ってVP貯蔵が枯渇するニューロンが増加することが示された。また、われわれはすでに、脱水刺激下のラットでは軸索を通過して運搬されるVP量が無刺激の状態よりも増加していることを報告している<sup>11)</sup>。これらのことから、VP需要が亢進すると、1) 視床下部から下垂体へのVP運搬量が増加、2) 同時に視床下部でのVP合成量が増加、3) 運搬量が合成量を上回るため視床下部VP含有量が減少、4) 視床下部および下垂体のVP貯蔵が枯渇、以上の過程を経て最終的には分泌不全が生じると考えられる。循環不全遷延期においても同様の機序によってVP濃度が低下するのであれば、VP投与がショック患者の予後を改善する可能性もある。

【文献】

- 1 Errington ML, Rocha e Silva M, Jr.: Vasopressin clearance and secretion during haemorrhage in normal dogs and in dogs with experimental diabetes insipidus. *J Physiol* 227: 395-418, 1972
- 2 Overand PT, Tepley JF: Vasopressin for the treatment of refractory hypotension after cardiopulmonary bypass *Anesth Analg* 86: 1207-9, 1998.
- 3 Aiura K, Ueda M, Endo M, et al.: Circulating concentrations and physiologic role of atrial natriuretic peptide during endotoxic shock in the rat. *Crit Care Med* 23: 1898-906, 1995.
- 4 Landry DW, Levin HR, Gallant EM, et al.: Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 95: 1122-5, 1997.
- 5 Morales D, Madigan J, Cullinane S, et al.: Reversal by vasopressin of intractable hypotension in the late phase of hemorrhagic shock. *Circulation* 100: 226-9, 1999.
- 6 Landry DW, Levin HR, Gallant EM, et al.: Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock. *Crit Care Med* 25: 1279-82, 1997.
- 7 Amaya F, Tanaka M, Hayashi S, et al.: Hypothalamo-pituitary-adrenal axis sensitization after chronic salt loading. *Neuroendocrinology* 73: 185-193, 2001.
- 8 Meister B, Villar MJ, Ceccatelli S, et al.: Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37: 603-33, 1990.
- 9 Meister B, Cortes R, Villar MJ, et al.: Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260: 279-97, 1990.
- 10 Landry D, Oliver J: The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345: 588-595, 2001.
- 11 Amaya F, Tanaka M, Tamada Y, et al.: The influence of salt loading on vasopressin gene expression in magno- and parvocellular hypothalamic neurons: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. *Neuroscience* 89: 515-23, 1999.

## Dynamic regulation of vasopressin synthesis and secretion in rat hypothalamus

Fumimasa Amaya, MD, PhD

Department of Emergency and Intensive Care Medicine, Otsu Municipal Hospital