

## ラット胎仔循環に対する心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANP) の作用

(平成3年8月19日受付)

(平成4年2月7日受理)

東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所循環器小児科

中沢 誠 森島 正恵 富田 幸子 梶尾 房枝

**key words:** 胎芽循環制御, 臍帯動脈圧, 血管拡張

### 要 旨

ラット胎仔の心臓大血管形態形成初期の心筋内に心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANP) が存在することが知られているがその生理的意義は不明である。そこで胎生12日目の胎仔でその血行動態作用を検討した。ANP 注入によって胎仔の血圧は変化しなかったが、心拍出量は増加する傾向を示した。この結果は、このホルモンが胎生初期の循環制御に関与している可能性を示唆した。

### はじめに

完成した個体に於ける循環制御は、自律神経系およびそれを通しての諸反射、内分泌系、それに心臓そのものの Frank-Starling 機構に依っている。しかし、形態形成初期には心臓大血管系への自律神経支配はなく<sup>1)</sup>、また、副腎など内分泌器官の発達も循環系のそれより遅れる<sup>2)</sup>。個体の発生段階に於いて循環系の機能的発達は他のいずれの器官より早く、単管 (single tube) の時期から既にポンプとして作用し、胎児の急速な発育を維持している<sup>3)</sup>。その時期の循環維持は個体の正常な発達にとってまさに vital である。そのためこの時期の循環制御、言い替れば循環維持には、未だ未完成の器官、機構に代わる他の何かが存在する必要がある。鶏胚 (chick embryo) を用いた研究では、温度変化による心拍数変化は心拍出量を変化させること<sup>4)5)</sup>、Frank-Starling 機構は弱いながら機能していること<sup>6)</sup>、が分かっている。この他、外因性ではあるが  $\alpha$  刺激剤による血管収縮<sup>7)</sup>、 $\beta$  刺激剤による血管拡張作用の存在も知られている<sup>8)9)</sup>。更に、我々は最近、鶏胚においてこの発生初期に心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANP) も血管拡張作用を有し、その循環制御に関与している可能性を示した<sup>10)</sup>。

これまでの我々の研究から、発生初期における種々の血管作動物質が鶏胚と哺乳類胎仔としてのラット胎仔とはかなり異なることを示してきた<sup>11)</sup>。一方で、胎生11日目ラット胎仔心で既に ANP 顆粒が認められるとの報告があり<sup>12)</sup>、腎臓発生以前の時期のこの顆粒の生理学的意義が疑問となる。そこで、ラット胎仔において ANP の臍帯動脈血圧、心拍出量、心拍数に対する作用を明らかにし、もし作用があれば鶏胚における作用との差は何か、を検討する目的で本研究を行った。

### 対象と方法

胎生12日目のラット胎仔を胎盤ごと母体から取り出し器官培養の手法を用いた灌流槽に入れ、槽の中で卵黄嚢を開き臍帯血管および胎仔を露出した (図1, 2)。臍帯動脈をガラス毛細管で穿刺し微小血圧計 (WPI, Model 900) を用いてその血圧を測定、胸壁を通して見える心流出路において20MHz ドプラ流速計 (Iowa 大学製) を用いて血流速度を測定した。後者は心拍出量を代表すると考えた。それぞれの測定は実験野が極めて小さいなどの技術的な制約のため別の個体でおこなった。血流または血圧を測定しながら、蒸留水で希釈した ANP 10ng, 1ml を微量注入装置 (WPI Model 1400) を用いて胎仔側胎盤内に注入した。これらの方法の詳細については既に別に報告してあるので<sup>13)14)</sup>、ここでは紙面の関係で簡単な記載にとどめた。尚、同量の Hank's 液のみの容量負荷によっては、血圧、血流

別刷請求先: (〒162) 東京都新宿区河田町 8-1

東京女子医科大学心研小児科

中沢 誠

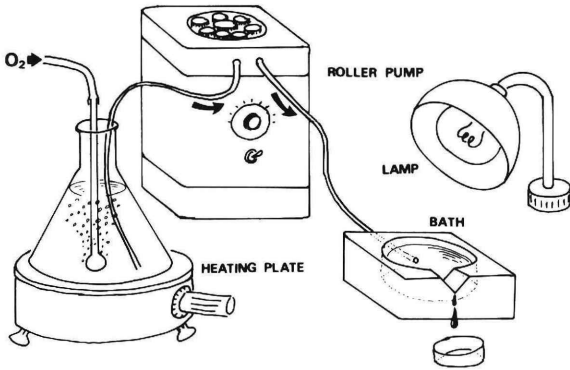


図1 実験に用いた灌流槽。三角フラスコ内で約40度に暖められたハンクス液を酸素化し、ローラーポンプで持続的に灌流槽 (bath) へと送る。bath 内の温度を針センサー温度計でモニターしながら、近くに置いた白熱灯で38度前後に保つ。

並びに心拍数に変化のないことは既に報告してある<sup>14)</sup>。

血圧、血流データは、鶏胚における経験から、ANP 注入直前と3分後に記録した。心拍数はそれらの記録から算出した。結果は平均±標準誤差で表し、対応のあるt-テストで統計的検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

平均臍帯動脈圧は注入前 $0.60 \pm 0.05$ mmHg、注入後 $0.60 \pm 0.03$ mmHg で変化せず(図3)、この時の心拍数は $147 \pm 5$  から $145 \pm 6$  ( $99 \pm 3\%$ )へとこれも変化なかった( $n=6$ )。流出路平均血流速度は1例を除いて不変ないし増加であったが(図4)、全体では投与前の $5.43 \pm 0.81$ mm/s、投与後の $5.80 \pm 0.83$ mm/s と有意の差とはならなかった( $0.05 < p < 0.1$ )。この時の心拍

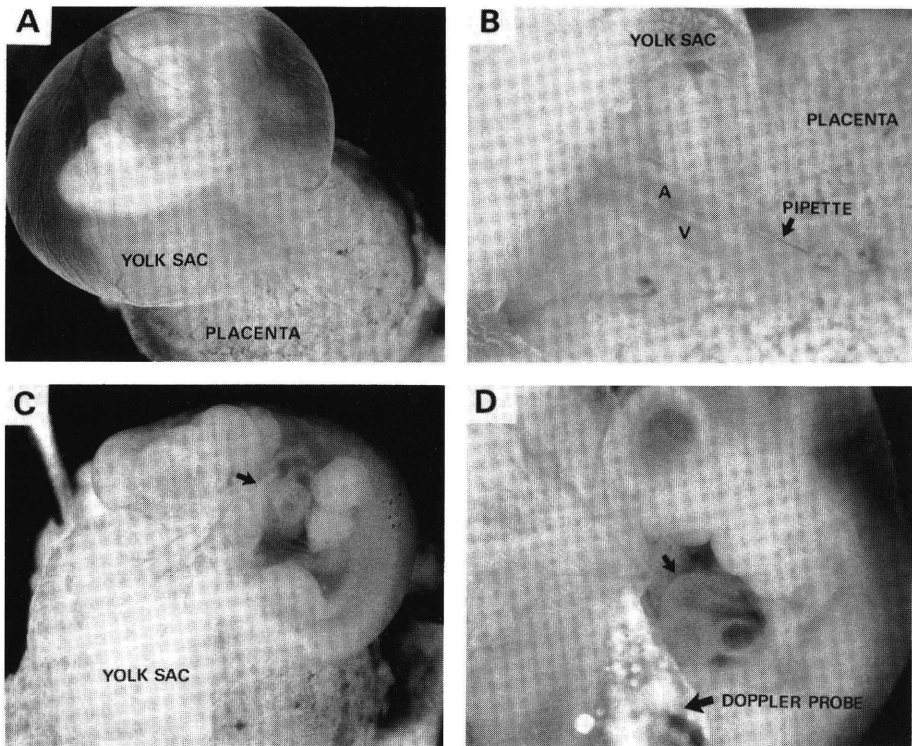


図2 胎仔標本

- A: ラット胎仔を子宮毎取り出し、bath へ移す。
- B: 卵黄嚢を切開し臍帯血管を露出させる。ガラス毛细管で動脈を穿刺し、微小血圧測定装置につなぎ血圧を測定する。
- C: 卵黄嚢から胎仔全体を露出させる。
- D: 20MHz 超音波ドップラー流速計の探触子をビームが心流出路内を貫くように当て血流速度を測定する。
- C, D 中の矢印は心臓の流出路を示す。

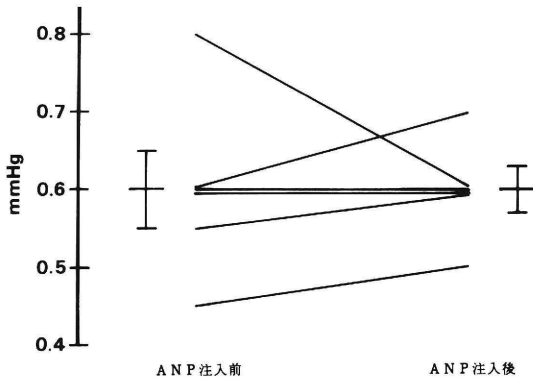


図3 臍帯動脈血圧の変化

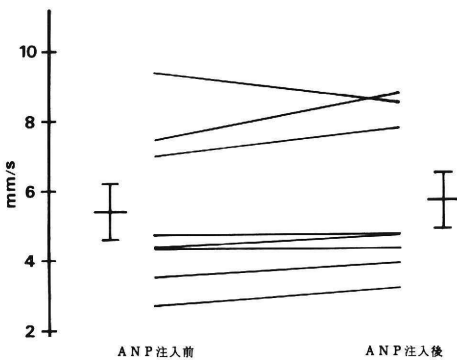


図4 流出路血流の変化

数も  $168 \pm 10$  から  $160 \pm 8$  ( $96 \pm 1\%$ ) と有意の変化はなかった ( $n=8$ )。

考 察

ANP 顆粒はラット胎仔では胎生11日目に既に存在が確認されているが<sup>12)</sup>、その生理的意義は未だ不明である。既に報告したごとく、鶏胚では卵黄静脈拡張による末梢へのプーリングのため、心臓への還流が減り(前負荷減少を通して)心拍出量が減り血圧が下がるが<sup>10)</sup>、ラット胎仔では本研究に見られるように血圧の変化は全くなかった。これは各々の embryo を支える循環の構造の違いによると考えられた。即ち、鶏胚の場合は血管のネットワークから成る卵黄循環が embryo とつながっており、血管の拡張収縮が大きな血行動態作用を有する構造となっている。これに対してラット胎仔につながっている胎盤循環は洞様構造を持ち、能動的な血管活動は無いと考えられる。これまでの我々の経験でも、鶏胚では血圧の変化をもたらすアセチルコリン、イソプロテレノール、カフェイン、高温が、ラット胎仔の臍帯動脈血圧には何等の影響を

与えないことが分かっている<sup>8)9)11)13)~15)</sup>。これらの刺激は胎仔そのものが循環系に血管作用を有する可能性はあるが、この時期の大きな胎盤(胎盤/胎仔重量比 =  $2.9 \pm 0.6$  (SD); 未発表データ)がリザボアとしての胎仔の血圧の変化を吸収してしまった可能性を考えた。従って、ここでみられた血圧の不変にも同様のメカニズムが働いていると見なされる。もし ANP に循環制御作用があるにせよ、それは血圧の変化を伴わないものであろうと言える。

心拍出量は全体の変化としては統計的に有意差とはならなかったが、1例を除き不変ないし増加であり、多少増加の傾向があるとも考えられる。データ収集の精度を考えればこれだけ小さな変化を確定することはかなり難しいが、もし心拍出量が増えたと判断すれば、血圧が不変だったことと合わせ抵抗血管の拡張が起こったことになる。即ち、ANP が胎仔体の末梢動脈を拡張させ末梢血管抵抗下降(後負荷軽減)から心拍出量を増加させた可能性を示すであろう。しかし、成熟した循環系でも鶏胚でも、この ANP は静脈系の強い拡張作用から心拍出量を減少させることが知られている。この点については今回静脈圧を測定できないので正確に判断はできない。ある程度の変化であれば、これも胎盤のリザボア作用によってマスクされてしまう可能性がある。大きな変化があれば心拍出量の減少となるが、後負荷の低下と相殺され見かけ上今回の結果となったか否かは不明である。

今回用いた ANP の投与量は鶏胚 (chick embryo) に於て明らかな変化をもたらした量である<sup>10)</sup>。この研究ではその結果をラット胎仔と比較することも目的としたので、むしろ初めから多量を用い、もし変化が大きければ量を減じて用量反応関係を検討する予定であった。しかるにこの量でもここに示したごとくその変化は僅かであったので、これより少量の実験は行わなかった。また、これより多量とすると比較となる鶏胚でのデータが無く、これも行わなかった。投与量の 10ng は胎仔体重平均 34mg、胎盤重量平均 94mg の循環では明らかに生理的な域を遙かに越えているため、このまま in situ へとは応用できないが、少なくとも胎仔の循環制御になんらかの役割を持っている可能性を示唆するものであろう。

結 論

1. ANP は胎生12日目のラット胎仔に(胎盤を含んだ循環)全体としては有意の変化をもたらさない。
2. ANP が胎仔の血管を拡張させている可能性が

示唆された。

### 文 献

- 1) Pappano, A.J.: Ontogenetic development of autonomic neuroeffector transmission and transmitter reactivity in embryonic and fetal hearts. *Pharmacol. Rev.*, 29: 3—33, 1977.
- 2) Bulter, H. and Jurlink, B.H.J.: *An Atlas for Staging Mammalian and Chick Embryos*. C.R. C. Press, Boca Raton, FL, 1987.
- 3) Hu, N. and Clark, E.B.: Hemodynamics of the stage 12 to stage 29 chick embryo. *Cric. Res.*, 65: 1665—1670, 1989.
- 4) Nakazawa, M., Clark, E.B., Hu, N. and Wispe, J.: Effect of environmental hypothermia on vitelline artery blood pressure and vascular resistance in the stage 18, 21, and 24 chick embryo. *Pediatr. Res.*, 19: 651—654, 1985.
- 5) Nakazawa, M., Miyagawa, S., Takao, A., Hu, N. and Clark, E.B.: Hemodynamic effects of environmental hyperthermia in stage 18, 21, and 24 chick embryos. *Pediatr. Res.*, 20: 1213—1215, 1986.
- 6) Wagman, A.J. and Clark, E.B.: Frank-Starling relationship in the developing cardiovascular system. In *Cardiac Morphogenesis*, Ferrans, V., Rosenquist, G., Weistein, C.(eds.), New York, Elsevier, 1985, p. 245—252.
- 7) Girard, H.: Adrenergic sensitivity of circulation in the chick embryo. *Am. J. Physiol.*, 224: 461—469, 1973.
- 8) 中沢 誠, 宮川幸子, 高尾篤良: 鶏胚におけるイソプロテレノールの心血管作用. *日小循誌*, 2: 238—243, 1986.
- 9) Ckark, E.B., Hu, N. and Dooley, J.B.: The effect of isoproterenol on cardiovascular function in the stage 24 chick embryo. *Teratology*, 31: 41—47, 1985.
- 10) Nakazawa, M., Kajio, F., Ikeda, K. and Takao, A.: Effect of atrial natriuretic peptide on hemodynamics of the stage 21 chick embryo. *Pediatr. Res.*, 27: 557—560, 1990.
- 11) Nakazawa, M., Miyagawa, S., Morishima, M., Takao, A., Ohno, T., Ikeda, K. and Mori, K.: Hemodynamic effects cardiovascular agents on the embryonic circulation: A comparative study in chick and rat embryos. In *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*, Clark, E.B., Takao, A(eds.), New York, Futura Publ. Co., 1990, p. 315—323.
- 12) Toshimori, H., Toshimori, K., Oura, C. and Matsuo, H.: Immunohistochemical study of atrial natriuretic polypeptides in the embryonic, fetal, and neonatal heart. *Cell Tissue Res.*, 248: 627—633, 1987.
- 13) Nakazawa, M., Miyagawa, S., Ohno, T., Miura, S. and Takao, A.: Developmental hemodynamic changes in rat embryos at 11 to 15 days of gestation: Normal data of blood pressure and the effect of caffeine compared to data from chick embryo. *Pediatr. Res.*, 23: 200—205, 1988.
- 14) Nakazawa, M., Ohno, T., Miyagawa, S. and Takao, A.: Hemodynamic effects of acetylcholine in the chick embryo and differences from those in the rat embryo. *Teratology*, 39: 555—561, 1989.
- 15) Nakazawa, M., Tomita, M.S., Morishima, M., Kajio, F. and Takao, A.: Effects of environmental hyperthermia on cardiovascular function in the rat embryo. *Pediatr. Res.*, 30: 505—508, 1991.

## Effect of Atrial Natriuretic Peptide on Cardiovascular Function in the Rat Embryo

Makoto Nakazawa, Masae Morishima, Sachiko M. Tomita and Fusae Kajio

Department of Pediatric Cardiology, The Heart Institute of Japan, Tokyo Women's Medical College

It is reported that atrial natriuretic peptide (ANP) is found in the heart of rat embryo as early as on 11th day of gestation although its physiological role has not been studied. We measured umbilical artery blood pressure and flow velocity at the outflow tract, a measure of cardiac output, of the embryonic heart of 12th day of gestation before and after infusion of ANP. The blood pressure did not change but the flow velocity increased from  $5.4 \pm 0.8$  (SE) mm/s to  $5.8 \pm 0.8$  mm/s ( $p < 0.1$ ). We conclude that ANP may have some role in the control of circulation during the early stage of cardiovascular development.