

フグから新たに抽出された アドレノメデュリンの腎作用について

堀 内 邦 祐*

Effects of a new member of adrenomedullin, adrenomedullin 2 on rat kidney

Kunisuke Horiuchi

要旨：アドレノメデュリンファミリーの新しい一員であるアドレノメデュリン2が哺乳類でみつきり、その腎血行動態と尿生成に対する作用についてラットを用いて調べた。30、100、300 pmol/kg/min と量を変えてアドレノメデュリン2を腎動脈内に注入した場合、注入量に応じて血圧の低下と心拍数の増加がみられた。アドレノメデュリン2を100 pmol/kg/min 注入した場合、腎血流量と尿量が有意に増加した。しかし、300 pmol/kg/min のアドレノメデュリン2では、尿量に有意の減少が見られた。100 pmol/kg/min の量を持続的に注入した場合、腎血流量は 6.7 ± 0.5 から 8.8 ± 0.5 ml/min に増加し、腎血管抵抗は 16 ± 1 から 11 ± 1 mmHg·min/ml へ低下した。尿量は 21.5 ± 4.9 から 36.2 ± 8.5 μ l/min に有意に増加し、ナトリウムの尿中排泄量は 2.3 ± 0.9 から 4.9 ± 1.4 μ Eq/min に増加した。血圧、心拍数及び糸球体濾過量には変化は認められなかった。同量のアドレノメデュリンを注入した場合では、腎血流量 (6.8 ± 0.4 から 8.8 ± 0.6 ml/min)、尿量 (25.4 ± 3.2 から 42.8 ± 9.4 μ l/min) 及び尿中ナトリウム排泄量 (2.8 ± 0.6 から 6.5 ± 1.2 μ Eq/min) は増加し、逆に腎血管抵抗 (15 ± 1 から 11 ± 1 mmHg·min/ml) は低下したが、糸球体濾過量には変化は認められなかった。アドレノメデュリン2の腎作用はアドレノメデュリンの作用とよく類似しており、このことから、アドレノメデュリン2が腎血行動態及び尿生成の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

Abstract : A new member of the adrenomedullin family, adrenomedullin 2 was identified in mammals. The effects of adrenomedullin 2 on renal hemodynamics and urine formation were examined in rats. Intrarenal arterial infusion of adrenomedullin 2 at rates of 30, 100 and 300 pmol/kg/min decreased blood pressure and increased heart rate in a dose-dependent fashion. Adrenomedullin 2 infusion at 100 pmol/kg/min significantly increased renal blood flow and urine flow. At the higher infusion rate (300 pmol/kg/min) adrenomedullin 2 significantly decreased urine flow. Continuous intrarenal infusion of adrenomedullin 2 at 100 pmol/kg/min significantly increased renal blood flow from 6.7 ± 0.5 to 8.8 ± 0.5 ml/min and decreased renal vascular resistance from 16 ± 1 to 11 ± 1 mmHg·min/ml. Urine flow was significantly increased from 21.5 ± 4.9 to 36.2 ± 8.5 μ l/min and urinary excretion of sodium was increased from 2.3 ± 0.9 to 4.9 ± 1.4 μ Eq/min. Blood pressure, heart rate and glomerular filtration rate did not change. Infusion of a similar dose of adrenomedullin also increased renal blood flow (6.8 ± 0.4 to 8.8 ± 0.6 ml/min), urine flow (25.4 ± 3.2 to 42.8 ± 9.4 μ l/

*関西福祉科学大学事務局 教務課長

min) and urinary excretion of sodium (2.8 ± 0.6 to $6.5 \pm 1.2 \mu\text{Eq}/\text{min}$), decreased renal vascular resistance (15 ± 1 to $11 \pm 1 \text{ mmHg} \cdot \text{min}/\text{ml}$) and did not alter glomerular filtration rate. Thus, the renal actions induced by adrenomedullin 2 were similar to those of adrenomedullin. These data suggest that adrenomedullin 2 may play an important role in the regulation of renal hemodynamics and urine formation.

Key words: アドレノメデュリン2 adrenomedullin 2 腎血行動態 renal hemodynamics 血管拡張 vasodilation 利尿 diuresis ナトリウム利尿 natriuresis

I はじめに

アミノ酸 52 残基からなる血管拡張物質、アドレノメデュリンはヒト褐色細胞腫の組織抽出物から最初に単離され¹⁾、その後、副腎、腎臓、心臓、肺臓、脾臓、脳など、多くの組織中にも存在することがわかり²⁻⁴⁾、最近では、血管内皮細胞や血管平滑筋からも分泌されることがわかってきた⁵⁻⁷⁾。実験動物にアドレノメデュリンを注入した場合、血圧の下降、利尿及びナトリウム利尿が起こる⁸⁻¹³⁾。又、心肥大¹⁴⁾、心不全¹⁵⁻¹⁸⁾、腎機能障害¹⁹⁾及び高血糖症²⁰⁾の患者で、血漿中のアドレノメデュリンが高値を示すことから、アドレノメデュリンがこれら種々の病態に関係していると考えられる。アドレノメデュリンは、オートクリンあるいはパラクリン的に働き、心血管障害²¹⁻²³⁾や腎障害^{24, 25)}を抑制しているという報告がある。このようにアドレノメデュリンはヒトの恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

最近、アドレノメデュリン様ペプチドの遺伝子情報をもつ5種のcDNAがフグで見つかり²⁶⁾、アドレノメデュリン1~5と命名された。硬骨魚で見出されたアドレノメデュリンファミリーのうち、アドレノメデュリン1、4、5は哺乳動物のアドレノメデュリンと同様多くの組織に分布しているが、アドレノメデュリン2と3は哺乳動物では見つからない。その後、Takeiらは、マウス、ラット、ヒトでアドレノメデュリン2の遺伝子情報をもつcDNAを見出した²⁷⁾。哺乳動物のアドレノメデュリン

2は、周辺遺伝子との塩基配列の類似性からフグのアドレノメデュリン2と近く、哺乳動物のアドレノメデュリンとは遠い関係にあると言える。アドレノメデュリン2のmRNAはラットの顎下腺、腎、胃及び卵巣で見ついているが、アドレノメデュリンを豊富に含む副腎や精巣では見つからない。アドレノメデュリン2をマウスの静脈内に注入した場合、血圧下降、抗利尿及び抗ナトリウム利尿が起こる。これらのことから、アドレノメデュリン2は全身の血行動態や体液の調節に重要な役割をもつと考えられる。しかし、腎血行動態や腎機能の制御におけるアドレノメデュリン2の役割については、血圧降下作用と抗利尿作用以外には何ら情報が得られていない。そのため、本実験では合成ヒトアドレノメデュリン2を用いて、ラットで腎血行動態と尿生成に対する作用を調べ、アドレノメデュリンの作用と比較検討した。

II 方法

1. 実験動物

実験には、体重 290~350 g、9~11 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を用いた。ラットは 12 時間の明暗サイクルで、温度調節された飼育室で、個別ケージ内で、標準飼料と水を自由に与えて飼育した。外科操作及び実験操作は全て香川大学医学部で定められた動物の取り扱いと使用についての指針に基づいて行った。

ペントバルビタール麻酔下で、ポリエチレンカテーテル (PE 50) を、右大腿動脈を経由して

腹部大動脈に挿入し、血圧測定と動脈血採取を行なった。別のカテーテル (PE 50) を、右大腿静脈を経由して大静脈に挿入し、等張生理食塩水を流速 $50 \mu\text{l}/\text{min}$ で注入した。大腿動脈のカテーテルは Statham 血圧トランスジューサー (P-23 ID) に接続した。心拍数は血圧脈波形から計測した。左腎を側腹切開により露出させ、腎神経を外科的に除神経した。ドップラーフロープローブ (HDP 10.20 R; Crystal Biotech, MA, USA) を腎動脈の周囲に装着し、腎血流量を経時的に測定した。ポリエチレンカテーテルを左輸尿管に挿入して尿を直接採取した。30 ゲージ針を左腎動脈に刺入し、生理的食塩水又は薬物溶液を注入した。ラットは手術終了後、血圧、腎血流量及び尿量が安定するまで 60 分間静置した。薬剤は全て生理的食塩水に溶解した。

2. 実験操作

生理的食塩水を $67 \mu\text{l}/\text{min}$ の流量で腎動脈内に注入し、コントロールとしての尿試料は 10 分間隔で 2 回採取した。全身動脈血は 2 回目のコントロール-クリアランス期間の中央で 0.5 ml を動脈カテーテルから採取した。血液と尿の試料についてクレアチニンと電解質の測定を行なった。2 回目のクリアランス期間終了後、アドレノメデュリン 2 又はアドレノメデュリンを次のプロトコールにしたがって腎動脈内に注入した。ヒトアドレノメデュリン 2 及びアドレノメデュリンはペプチド研究所から購入した。

プロトコール 1. 腎血行動態及び尿生成に対するアドレノメデュリン 2 の用量作用相関

アドレノメデュリン 2 に対する血圧、腎血流量及び尿量の用量作用相関を 5 匹のラットで検討した。2 回目のクリアランス期間終了後、アドレノメデュリン 2 を $30 \text{ pmol}/\text{kg}/\text{min}$ の流量で 20 分間腎動脈内に注入した。尿試料採取後、アドレノメデュリン 2 の量を $30 \text{ pmol}/\text{kg}/\text{min}$ から $100, 300 \text{ pmol}/\text{kg}/\text{min}$ と 20 分間隔で連続的

に増加させて夫々の期間に尿及び血液試料を採取した。

プロトコール 2. 腎機能に対するアドレノメデュリン 2 及びアドレノメデュリンの作用

腎動脈圧の変動は腎機能に有意の影響を与えるので、プロトコール 1 による実験の結果に基づいて、血圧に与える影響の少ないアドレノメデュリン 2 の用量 ($100 \text{ pmol}/\text{kg}/\text{min}$) を選んだ。又、アドレノメデュリンについても同じ量を用いた。2 回目のコントロール-クリアランス期間終了後、アドレノメデュリン 2 ($n=8$) 又はアドレノメデュリン ($n=8$) を $100 \text{ pmol}/\text{kg}/\text{min}$ の用量で 30 分間、腎動脈内に注入した。アドレノメデュリン 2 あるいはアドレノメデュリン注入開始の 5 分後から 2 回の 10 分間のクリアランス期間をとった。尿及び血液試料は、コントロール時と同様に採取した。アドレノメデュリン 2 又はアドレノメデュリンの注入を停止した後、生理的食塩水を 40 分間注入し、腎機能変化の回復度を評価した。尿試料は 4 回の 10 分間のクリアランス期間中に、血液試料は最後のクリアランス期間に採取した。

3. 分析操作

血液及び尿中クレアチニン濃度は Bosnes と Taussky²⁸⁾ の方法を用いて測定した。尿中のナトリウム量は炎光光度計 (Model 750; Hitachi, Japan) により測定した。腎血管抵抗は平均血圧/腎血流量として算出した。ナトリウムの尿中排泄率 (FENa) は $\text{UNaV}/(\text{PNa} \cdot \text{GFR}) \cdot 100$ で算出した。UNaV 及び PNa \cdot GFR は夫々尿中排泄量及び糸球体で濾過されたナトリウム量を示している。GFR は糸球体濾過量を示す。

4. 統計

数値は全て、平均値 \pm 標準誤差で示した。データは Student's t-test 又は 2 元配置分散分析法により解析した (Bonferroni)。

p-値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意と

みなした。

Ⅲ 結 果

1. 腎血行動態及び尿生成に対するアドレノメデュリン2の用量作用相関

血圧、心拍数、腎血流量及び尿量の反応についての結果を表1に示す。アドレノメデュリン2を腎動脈内に注入した場合、用量に応じて血圧は低下し、心拍数は増加した。これらの変化は高用量のアドレノメデュリン2で顕著であった。腎血流量と尿量は100 pmol/kg/minのアドレノメデュリン2を注入した場合にのみ有意に

表1 Dose responses of mean blood pressure (MBP), heart rate (HR), renal blood flow (RBF) and urine flow (UF) to intrarenal infusion of adrenomedullin 2 (AM2). *p<0.05 vs. vehicle.

| Infusion rate (pmol/kg/min) | vehicle | 30 | 100 | 300 |
|-----------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MBP (mmHg) | 90±1 | 89±1 | 85±2 | 73±1* |
| HR (beats/min) | 385±6 | 386±6 | 405±14 | 419±10 |
| RBF (ml/min) | 6.7±0.5 | 7.4±0.4 | 8.8±0.5* | 8.0±0.9 |
| UF (μl/min) | 25.3±3.9 | 26.3±5.0 | 45.6±7.3* | 13.2±3.7* |

増加した(腎血流量: 6.7±0.5 から 8.8±0.5 ml/min、尿量: 25.3±3.9 から 45.6±7.3 μl/min)。これらに対し、尿量は300 pmol/kg/minの用量で有意に減少した(25.3±3.9 から 13.2±3.7 μl/min)。このように血圧の下降に伴い抗利尿作用が見られたので、以下の実験では血圧低下作用の少ない100 pmol/kg/minの用量で、アドレノメデュリン2及びアドレノメデュリンの腎機能への影響を検討した。

2. 腎機能に対するアドレノメデュリン2及びアドレノメデュリンの作用

血圧、心拍数、腎血流量及び腎血管抵抗のアドレノメデュリン2とアドレノメデュリンに対する反応の時間変化を表2に示す。

アドレノメデュリン2又はアドレノメデュリンを100 pmol/kg/minの用量で腎動脈内に注入した場合、これら物質を注入している間、僅かに血圧が下降したが、有意の変化とは認められなかった。心拍数は、アドレノメデュリン2の注入中は変化しなかったが、アドレノメデュリンの注入時には軽度増加した。腎血流量はアドレノメデュリン2の注入時には6.7±0.5 から 8.8±0.5 ml/minに有意に増加したが、注入停止後20分以内にコントロールの値に戻った。アドレノメデュリンも同様に腎血流量を6.8±0.4

表2 Time courses of MBP, HR, RBF and renal vascular resistance (RVR) responses to adrenomedullin (AM2, 100 pmol/kg/min) and adrenomedullin (AM, 100 pmol/kg/min) *p<0.05 vs. control.

| Infusion Time (min) | | -15 | -5 | 15 | 25 | 45 | 65 |
|---------------------|-----|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| BP (mmHg) | AM2 | 104±3 | 104±3 | 98±3 | 98±2 | 105±4 | 102±5 |
| | AM | 102±3 | 107±4 | 98±3 | 94±2 | 104±2 | 106±2 |
| HR (beats/min) | AM2 | 392±7 | 403±8 | 407±6 | 409±6 | 409±13 | 386±10 |
| | AM | 400±6 | 403±8 | 420±11 | 438±10* | 436±10* | 421±10 |
| RBF (ml/min) | AM2 | 6.7±0.5 | 7.0±0.5 | 8.8±0.5* | 9.0±0.6* | 7.8±0.5 | 7.5±0.5 |
| | AM | 6.8±0.4 | 7.1±0.4 | 8.8±0.6* | 9.2±0.8* | 9.1±0.7* | 8.5±0.6 |
| RVR (mmHg·min/ml) | AM2 | 16.0±1.0 | 15.6±1.3 | 11.0±1.0* | 11.3±0.7* | 14.0±1.0 | 14.2±0.9 |
| | AM | 15.0±1.0 | 15.4±1.4 | 11.0±1.0* | 10.8±0.9* | 12.3±1.1* | 13.3±1.0 |

から 8.8 ± 0.6 ml/min に増加したが、注入停止後も増加した値を持続した。アドレノメデュリン 2 もアドレノメデュリンも共に腎血管抵抗値を夫々、 16.0 ± 1.0 から 11.0 ± 1.0 mmHg·min/ml と 15.0 ± 1.0 から 11.0 ± 1.0 mmHg min/ml に減少させ、どちらも腎血管拡張作用を有することを示している。

3. 尿生成に対するアドレノメデュリン 2 及びアドレノメデュリンの作用

アドレノメデュリン 2 及びアドレノメデュリンの尿生成に対する作用を表 3 に示す。アドレノメデュリン 2、アドレノメデュリンのいずれも糸球体濾過量に何ら作用を示さなかった。アドレノメデュリン 2 は尿量とナトリウムの尿中排泄量を夫々、 21.5 ± 4.9 から 36.2 ± 8.5 μ l/min 及び 2.3 ± 0.9 から 4.9 ± 1.4 μ Eq/min に有意に増加させたが、注入停止 20 分後にはコントロール値まで戻った。糸球体濾過量に変化がないにもかかわらずナトリウムの尿中排泄量がアドレノメデュリン 2 の注入時には有意に増加することから、尿細管でのナトリウムの再吸収が抑制されていることが分かる。アドレノメデュリンも同様に尿量とナトリウムの尿中排泄量を増加するが、注入停止 40 分後でも高い値 (8.2 ± 1.4 μ Eq/min) を維持した。

IV 考 察

最近、アドレノメデュリン様ペプチドがフグから見つかり、アドレノメデュリン 1~5 と命名された²⁶⁾。フグのアドレノメデュリンファミリーのうち、フグアドレノメデュリン 1、4、5 の遺伝子は哺乳動物のアドレノメデュリンと同様、多くの組織中に存在するが、アドレノメデュリン 2 と 3 は哺乳動物には見られなかった。Takei らは、2004 年にアドレノメデュリンファミリーの新しく見つかったアドレノメデュリン 2 の遺伝子情報を有する cDNA をマウス、ラット及びヒトで同定した。アドレノメデュリン 2 mRNA はマウスの多くの組織、特に腎臓に存在するが、副腎には見られなかったと報告している²⁷⁾。このようにアドレノメデュリン 2 の組織間分布がアドレノメデュリンと異なっていることは非常に興味深い。しかし、血漿および組織中のアドレノメデュリン 2 の生理的意義は未だ明らかにされていない。それにしても、アドレノメデュリン 2 mRNA が腎に多く分布していることは、アドレノメデュリン 2 が腎機能の局所的制御に関与していることをうかがわせるものである。事実、Takei ら²⁷⁾の報告では、アドレノメデュリン 2 をマウスの静脈内に投与すると、血圧降下、抗利尿及び抗ナトリウム利尿が起こり、アドレノメデュリン 2 が全身の血行動態及び体液の調節に重要な役割を果たすこと

表 3 Renal responses to intrarenal infusion of AM 2 (100 pmol/kg/min) and AM (100 pmol/kg/min). GFR, glomerular filtration rate, UNaV, urinary excretion of sodium, FENa, fractional excretion of sodium. *p<0.05 vs. control. #p<0.05 vs. AM 2

| | control | AM 2 | recovery | control | AM | recovery |
|-------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|------------------|---------------------|
| UF (μ l/min) | 21.5 ± 4.9 | $36.2 \pm 8.5^*$ | 28.4 ± 7.8 | 25.4 ± 3.2 | $42.8 \pm 9.4^*$ | $57.6 \pm 9.4^{\#}$ |
| GFR (ml/min) | 1.0 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | 1.0 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 1.0 ± 0.1 |
| UNaV (μ Eq/min) | 2.3 ± 0.9 | $4.9 \pm 1.4^*$ | 4.0 ± 0.9 | 2.8 ± 0.6 | $6.5 \pm 1.2^*$ | $8.2 \pm 1.4^{\#}$ |
| FENa (%) | 1.8 ± 0.5 | $2.8 \pm 0.6^*$ | 3.1 ± 0.7 | 2.7 ± 0.6 | $3.9 \pm 0.9^*$ | $6.1 \pm 1.4^{\#}$ |

を示唆する。一方、アドレノメデュリンは強い血管拡張物質であり、血圧降下作用、利尿作用及びナトリウム利尿作用を有することはよく知られている。このように、アドレノメデュリン2の腎作用をアドレノメデュリンのものと比較することは、アドレノメデュリン2の生理的役割を解明する上で意味のあることである。

本実験において、アドレノメデュリン2をラット腎動脈内に100 pmol/kg/minの用量で注入した場合、腎血流量が増加するが、血圧や心拍数に変化が認められなかったことから、アドレノメデュリン2は腎血管に対して拡張作用を有するものであることが示唆される。更に、アドレノメデュリン2は尿量とナトリウムの尿中排泄量を増加させるが、糸球体濾過量には変化が見られなかったことから、アドレノメデュリン2はナトリウムの尿細管での再吸収を抑制することが示唆される。しかし、アドレノメデュリン2の腎でのこれらの作用はアドレノメデュリン2の注入を停止した10~20分後には消失する。アドレノメデュリンを腎動脈内に100 pmol/kg/minの用量で注入した場合、腎血流量と尿量が増加した。これらの変化はアドレノメデュリン2によって生じたものとほとんど同じであった。しかし、これらの変化はアドレノメデュリンの注入を停止した後40分間経過しても高い値を維持した。このように、アドレノメデュリン2とアドレノメデュリンの腎作用はよく似ているが、アドレノメデュリン2の腎への作用時間はアドレノメデュリンに比べ短いように見える。

アドレノメデュリンは、各種実験動物⁸⁻¹³⁾やヒト^{4, 29, 30)}で利尿やナトリウム利尿を引き起こす強い血管拡張物質であることは良く知られているところである。アドレノメデュリンのこれらの作用は、アデニルサイクラーゼ-サイクリックAMP系またはNO(一酸化窒素)-サイクリックGMPとカップルした受容体を介して伝達されることはよく知られている^{13, 22, 31-33)}。本実験では、アドレノメデュリン2にも強い腎

血管拡張作用があることが証明され、この作用はアドレノメデュリン2注入開始直後から発現し、注入停止20分後に消失する。一方、アドレノメデュリンによる腎血管拡張はアドレノメデュリン注入停止後も持続する。このアドレノメデュリンの作用が長期間持続することはVariらにより既に報告されている³⁴⁾。更に、アドレノメデュリン2とアドレノメデュリンの両者は腎血流量を増加させるが、糸球体濾過量を増加させないことは、これらの物質が輸入細動脈及び輸出細動脈の双方を同程度拡張させることを示している。このように、アドレノメデュリン2の血管拡張作用はアドレノメデュリンの作用と類似しているが、アドレノメデュリン2の作用持続時間がアドレノメデュリンと比べ短いといえる。

中等量のアドレノメデュリン2を注入すると利尿とナトリウム利尿が起こり、腎血流量は増加するが、糸球体濾過量は変化しない。結果として、濾過率は低下する。これらの結果から、アドレノメデュリン2はナトリウムと水の尿細管での再吸収を直接又は間接的に抑制することが示唆される。濾過率の低下は尿細管周囲毛細血管中の蛋白質濃度とコロイド浸透圧を低下させ、近位尿細管での再吸収の抑制を引き起こすと考えられる。しかしながら、アドレノメデュリン2の受容体及び細胞内情報伝達系が未だ解明されていない現在、今回の実験結果に基づき、アドレノメデュリン2の利尿作用及びナトリウム利尿作用がアドレノメデュリン2の尿細管への直接の作用により生じたものかどうかについては言及出来ない。しかしながら、高用量のアドレノメデュリン2は血圧低下を伴う尿量の減少を引き起こす。Takeiらは、アドレノメデュリン2の静脈内注入により血圧が有意に低下すると共に抗利尿が起こることを報告している²⁷⁾。今回の実験においても高用量(300 pmol/kg/min)のアドレノメデュリン2で抗利尿が起こることが同様に認められた。このようにアドレノメデュリン2は本質的には利尿作用とナ

トリウム利尿作用を有する。しかし、高用量の投与による血圧低下が本来の利尿作用をマスクしたと考えられる。アドレノメデュリンもアドレノメデュリン2と同様利尿作用を有するが、アドレノメデュリンの利尿作用は注入停止後も持続する。このようにアドレノメデュリン2はアドレノメデュリンとよく似た利尿作用及びナトリウム利尿作用を示すが、腎血管に対する作用と同様作用持続時間が短いと言える。

結論：アドレノメデュリンファミリーの新しい一員であるアドレノメデュリン2を、ラットに100 pmol/kg/minの用量で腎動脈内に注入すると腎血流量、尿量及びナトリウムの尿中排泄量が有意に増加する。これらアドレノメデュリン2の腎作用はアドレノメデュリンのそれらと類似していた。これらの知見はアドレノメデュリン2が腎血行動態及び尿生成に重要な役割を果たすことを示唆している。

References

- 1) Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., Eto, T., 1993. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 553–60.
- 2) Ichiki, Y., Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Matsuo, H., Eto, T., 1994. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett.* 338, 6–10.
- 3) Sakata, J., Sbmokubo, T., Kitamura, K., Nishizono, M., Iehiki, Y., Kangawa, K., Matsuo, H., Eto, T., 1994. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Lett.* 352, 105–8.
- 4) Eto, T., 2001. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides.* 22, 1693–711.
- 5) Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Eto, T., Matsuo, H., 1995. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate productions of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 25–32.
- 6) Chun, T. H., Itoh, H., Ogawa, Y., Tamura, N., Takaya, K., Igaki, T., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Korenaga, R., Ando, J., Nakao, K., 1997. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension.* 29, 1296–302.
- 7) Isumi, Y., Shoji, H., Sugo, S., Tochimoto, T., Yoshioka, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Minamino, N., 1998. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology.* 139, 838–46.
- 8) Ebara, T., Miura, K., Okumura, M., Matsuura, T., Kim, S., Yukimura, T., Iwao, H., 1994. Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and functions in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 263, 69–73.
- 9) He, H., Bessho, H., Fujisawa, Y., Horiuchi, K., Tomohiro, A., Kita, T., Aki, Y., Kimura, S., Tamaki, T., Abe, Y., 1995. Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional hemodynamics in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 273, 209–14.
- 10) Jougasaki, M., Wei, C. M., Aarhus, L. L., Heublein, D. M., Sandberg, S. M., Burnett, J. C., Jr., 1995. Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide. *Am. J. Physiol.* 269, F 657–63.
- 11) Parkes, D. G., 1995. Cardiovascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Am. J. Physiol.* 268, H 2574–8.
- 12) Majid, D. S., Kadowitz, P. J., Coy, D. H., Navar, L. G., 1996. Renal responses to intra-arterial administration of adrenomedullin in dogs. *Am. J. Physiol.* 270, F 200–5.
- 13) Willsbrock, R., Pagel, I., Krause, E. G., Scheuermann, M., Dietz, R., 1999. Acute hemodynamic and renal effects of adrenomedullin in rats with aortocaval shunt. *Eur. J. Pharmacol.* 369, 195–203.
- 14) Nishikimi, T.; Matsuoka, H., Ishikawa, K., Yoshihara, F., Kawano, Y., Kitamura, K., Saito, Y., Kangawa, K., Matsuo, H., Omae, T., 1996. Antihypertensive therapy reduces increased plasma levels of adrenomedullin and brain natriuretic peptide concomitant with regression of left ventricular hypertrophy in a patient with malignant hypertension. *Hypertens. Res.* 19, 97–101.

- 15) Kato, J., Kobayashi, K., Etoh, T., Tanaka, M., Kitamura, K., Imamura, T., Koiwaya, Y., Kangawa, K., Eto, T., 1996. Plasma adrenomedullin concentration in patients with heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 180–3.
- 16) Nakamura, M., Yoshida, H., Makita, S., Arakawa, N., Niinuma, H., Hiramori, K., 1997. Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation.* 95, 1214–21.
- 17) Gao, Y. Q., Li, Z. L., Wu, H. C., Tang, C. S., Zhong, P., Lu, Q., Yan, Q. N., 2002. Changes of plasma adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide concentrations in patients with heart failure. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 22, 632–4
- 18) Osajima, A., Okazaki, M., Tamura, M., Anai, H., Kabashima, N., Suda, T., Iwamoto, M., Ota, T., Watanabe, Y., Kanegae, K., Nakashima, Y., 2002. Comparison of plasma levels of mature adrenomedullin and natriuretic peptide as markers of cardiac function in hemodialysis patients with coronary artery disease. *Nephron.* 92, 832–9.
- 19) Cheung, B., Leung, R., 1997. Elevated plasma levels of human adrenomedullin in cardiovascular, respiratory, hepatic and renal disorders. *Clin. Sci. (Lond).* 92, 59–62.
- 20) Hayashi, M., Shimosawa, T., Fujita, T., 1999. Hyperglycemia increases vascular adrenomedullin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 453–6.
- 21) Tsuruda, T., Kato, J., Kitamura, K., Kuwasako, K., Imamura, T., Koiwaya, Y., Tsuji, T., Kangawa, K., Eto, T., 1998. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension* 31, 505–10.
- 22) Terata, K., Miura, H., Liu, Y., Loberiza, F., Gutterman, D. D., 2000. Human coronary Arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K (+)-channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H 2620–6.
- 23) Dobrzynski, E., Montanari, D., Agata, J., Zhu, J., Chao, J., Chao, L., 2002. Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E 1291–8.
- 24) Owada, A., Nonoguchi, H., Terada, Y., Marumo, F., Tomita, K., 1997. Microlocalization and effects of adrenomedullin in nephron segments and in mesangial cells of the rat. *Am. J. Physiol.* 272, F 691–7.
- 25) Nishimatsu, H., Hirata, Y., Shindo, T., Kurihara, H., Kakoki, M., Nagata, D., Hayakawa, H., Satonaka, H., Sata, M., Tojo, A., Suzuki, E., Kangawa, K., Matsuo, H., Kitamura, T., Nagai, R., 2002. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury: studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. *Circ. Res.* 90, 657–63.
- 26) Ogoshi, M., Inoue, K., Takei, Y., 2003. Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 1072–7.
- 27) Takei, Y., Inoue, K., Ogoshi, M., Kawahara, T., Bannai, H., Miyano, S., 2004. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett.* 556, 53–8.
- 28) Bonsnes, R. W., Taussky, H. H., 1945. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* 158, 581–591.
- 29) Nagaya, N., Satoh, T., Nishikimi, T., Uematsu, M., Furuichi, S., Sakamaki, F., Oya, H., Kyotani, S., Nakanishi, N., Goto, Y., Masuda, Y., Miyatake, K., Kangawa, K., 2000. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 101, 498–503.
- 30) McGregor, D. O., Troughton, R. W., Frampton, C., Lynn, K. L., Yandle, T., Richards, A. M., Nicholls, M. G., 2001. Hypotensive and natriuretic actions of adrenomedullin in subjects with chronic renal impairment. *Hypertension.* 37, 1279–84.
- 31) Miura, K., Ebara, T., Okumura, M., Matsuura, T., Kim, S., Yukimura, T., Iwao, H., 1995. Attenuation of adrenomedullin-induced renal vasodilatation by NG-nitro L-arginine but not glibenclamide. *Br. J. Pharmacol.* 115, 917–24.
- 32) Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., Matsuo, H., 1995. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic

- endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 4412-7.
- 33) Edwards, R. M., Trizna, W., Stack, E., Aiyar N., 1996. Effect of adrenomedullin on cAMP levels along the rat nephron: comparison with CGRP. *Am. J. Physiol.* 271, F 895-9.
- 34) Vari, R. C., Adkins, S. D., Samson, W. K., 1996. Renal effects of adrenomedullin in the rat. *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 178-83.