

血漿からの抽出を必要としない Direct radioimmunoassay による hANP 測定 of 臨床的検討

第1編 心不全重症度評価の妥当性について

(平成2年9月27日受付)

(平成3年6月27日受理)

埼玉県立小児医療センター循環器科 (*現 烏山クリニック)

小川 潔 矢野 一郎 藤原 優子

星野 健司 簡 瑞祥*

同 放射線部

荒井 孝 山本 英明

key words : 心房性 Na 利尿ペプチド, hANP, radioimmunoassay, 心不全

要 旨

血漿からの抽出操作を必要としない direct radioimmunoassay を用いて hANP 濃度を測定し、小児の正常値を検討するとともに各先天性心疾患に伴う心不全の重症度評価の妥当性について検討を加えた。

1カ月~15歳の健康小児における血中 hANP 濃度には年齢による差は認められず、小児期の正常値は $54.0 \pm 19.0 \text{ pg/ml}$ で、健康成人と同様であった。

臨床的に高度の心不全を伴っていると考えられた総肺静脈還流異常症や大動脈縮窄複合では、血中 hANP 濃度は著しい高値を示した。肺動脈弁狭窄や大動脈弁狭窄では、心不全を伴う重症例でのみ血中 hANP 濃度は上昇していた。心室中隔欠損では、臨床的に心不全を伴うと思われる例で有意に高値を示していた。ファロー四徴症では、術後有意に上昇していた。

direct radioimmunoassay により測定した血中 hANP 濃度は、臨床的な心不全の重症度を良く反映していた。しかも本法は、煩雑な血漿からの抽出操作を必要としないため、多検体を測定することが可能であり、検体量も少なく、広く臨床の場で利用することができる有用な測定法であると考えられた。

はじめに

ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (human Atrial Natriuretic Polypeptide, hANP) は心房より分泌されるホルモンで、Na 利尿作用・平滑筋弛緩作用・血管拡張作用などの生理作用を有する¹⁾ことが注目されている。循環器領域では心房負荷により高値を示す²⁾ことから、心不全の指標としての臨床的意義が検討されている。

従来の Radioimmunoassay 法 (RIA 法) では血漿中

からの抽出操作が必要^{3)~6)}であり、広く臨床応用に供するには煩雑であり⁷⁾、抽出による誤差の出現などの問題があった。著者らは血漿中からの抽出操作の不要な直接法による RIA 法 (direct radioimmunoassay) によって小児の血漿中の hANP 測定を行ない、その有用性と小児の年齢による正常値の差を検討した。

対 象

対象は、新生児から15歳までの心疾患を持たない健康小児105例と各種心疾患児151例である。健康小児群は、機能的な心雑音と診断された例や合併症を持たない川崎病既往例である。心疾患群の内訳は、肺動脈弁狭窄 (PS) 20例 (1~15歳, 6.1 ± 4.6 歳, 平均±標準偏

別刷請求先: (〒339) 岩槻市馬込2100

埼玉県立小児医療センター循環器科

小川 潔

差), 大動脈弁狭窄(AS) 8例(22日~16歳, 6.4±6.1歳), 大動脈縮窄複合(CoA) 13例(0日~1ヵ月, 13.7±15.2日), 総肺静脈還流異常(TAPVR) 7例(4日~1ヵ月, 27.6±24.2日), 動脈管開存(PDA) 17例(4ヵ月~16歳, 4.1±5.0歳), 心房中隔欠損(ASD) 38例(1~16歳, 9.0±5.2歳), 心室中隔欠損(VSD) 32例(25日~2歳, 9.1±7.0月), ファロー四徴症(TOF) 16例(1~4歳, 2.8±1.1歳)である。

方法

hANPの測定には栄研化学社製 human ANP “栄研” キットを用いて行なった。同キットは血漿からの抽出操作の不要なRIA キットである。

通常の末梢静脈からの採血操作により採取した検体をすみやかに冷却遠心して血漿を分離し、-30℃で保存した。hANP 測定の全行程は3日間を要し、まず血漿0.1ml および標準 hANP 溶液0.1ml に抗 hANP ウサギ血清を0.1ml 加え、4℃で24時間インキュベートする。2日目にトレーサーとして I-125標準 hANP 溶液0.1ml を加え、更に4℃で24時間インキュベートする。3日目に第2抗体として抗ウサギ IgG ヤギ血清0.1ml を加え、4℃で30分インキュベート後、4℃, 3,000rpm で30分遠心分離し、上清をアスピレート除去後、試験管内の放射能を測定した(図1)。

平均値の統計学的有意差検定には、Student's t test を用いた。

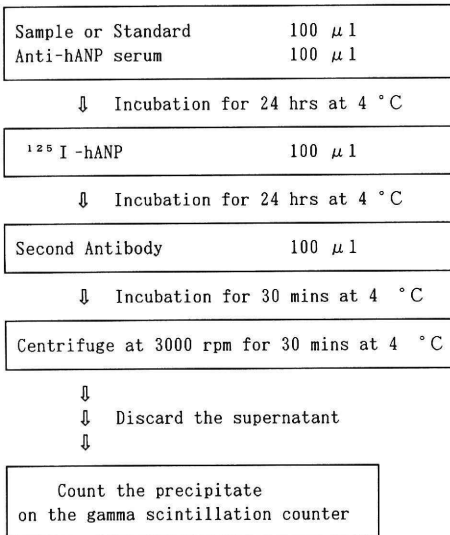


図1 hANP assay procedure

結果

1) 健常小児群について(図2)

健常小児群105例を年齢により5群に分類した。即ち、A群: 1ヵ月~1歳, 17例, B群: 1~2歳, 23例, C群: 3~5歳, 16例, D群: 6~11歳, 20例, E群: 12~16歳, 29例である。各群の血中 hANP 濃度は、A群: 58.2±20.2(平均値±標準偏差)pg/ml, B群: 56.6±20.9pg/ml, C群: 58.0±24.3pg/ml, D群: 49.0±18.2pg/ml, E群: 50.7±12.9pg/ml, 全群では 54.0±19.0pg/ml であった。各群の間に有意差はなかった。

2) 心疾患群について

a) 左-右短絡群について(図3)

PDA では、血中 hANP 濃度は32.9~479.0(156.7±

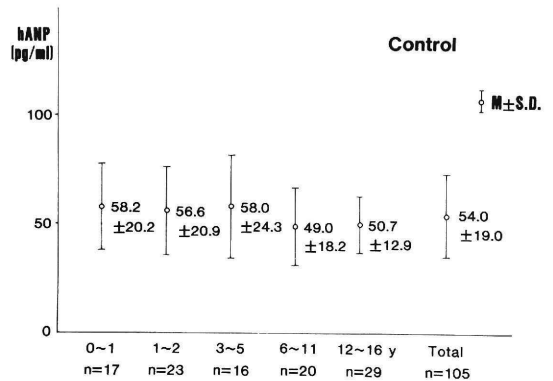


図2 健常小児における血中 hANP 濃度。年齢差は認められなかった。

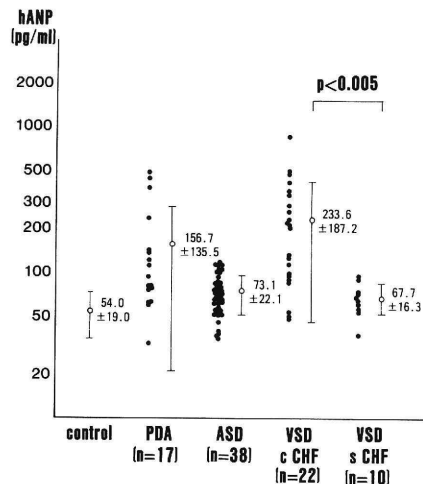


図3 左右短絡群における血中 hANP 濃度

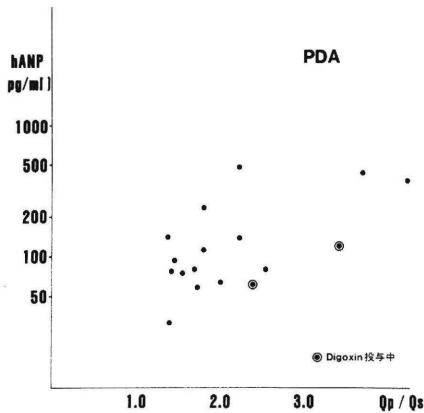


図 4 PDA における血中 hANP 濃度と肺体血流比の関係。有意な相関は認められなかった。

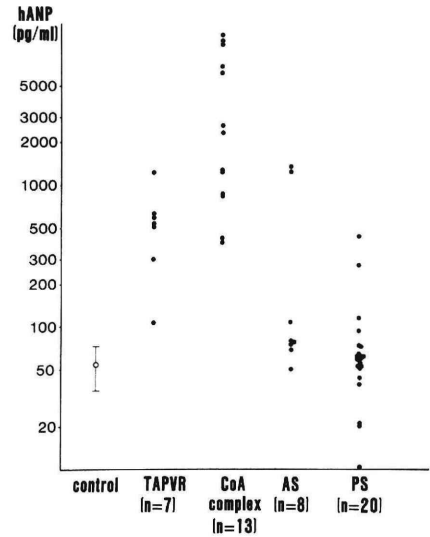


図 5 左右短絡群以外の先天性心疾患における血中 hANP 濃度

135.5) pg/ml であった。ASD では、35.1~116.0 (73.1±22.1) pg/ml で、38 例中 9 例で血中 hANP 濃度が 100pg/ml 以上を示していた。PDA では、血中 hANP 濃度と hANP 採血の翌日行った心臓カテーテル検査により求めた肺/体血流比との間には有意な相関関係は得られなかった (図 4)。

VSD 32 例を臨床的に心不全の有無により 2 群に分類した。心不全は、①-1SD 以上の体重増加不良、②陥没呼吸などの呼吸困難、③明らかな肝脾腫、④心電図や胸部 X 線上の心負荷・心拡大・肺うっ血のうちの 2 項目以上が認められるものとした。

心不全があると考えられる群 22 例では 49.7~493.0 (233.6±187.2) pg/ml で、心不全がないと考えられる群 10 例では 37.9~96.5 (67.7±16.3) pg/ml であり、心不全があると考えられた群の方が有意に高値を示した (p<0.005) (図 3)。

b) 他の心疾患について (図 5)

乳児期早期に重篤な心不全を呈し手術を行なう必要のあった TAPVR と CoA における術前の血中 hANP 濃度は、TAPVR では 107.3~1,237.0pg/ml、CoA では 393.7~12,800 以上と極めて高い値を示し、健常小児に比較して有意差を認めた (p<0.005)。

心室に対する圧負荷となる AS および PS では、AS が 50.5~1,343.0pg/ml で、2 例だけが 1,000pg/ml 以上を示していたが、いずれも乳児期早期に重篤な心不全を呈するいわゆる critical AS の症例であった。PS では 9.9~429.4 (84.2±92.3) pg/ml で、肺動脈右室圧較差 90mmHg 以上の例では健常小児の平均値+標準偏差を超えていた (図 6)。最大値を示した例は、乳

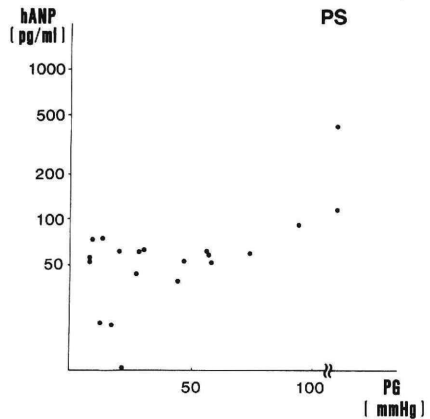


図 6 肺動脈弁狭窄における血中 hANP 濃度と肺動脈右室圧較差との関係。100mmHg 以上の圧較差のある例で血中 hANP 濃度は高値を示した。

児期にチアノーゼが出現して手術を必要とした重症例であった。

TOF では、血中 hANP 濃度は心内修復術前 66.2±29.0pg/ml から術後 332.5±191.2pg/ml に有意に増加していた (p<0.005) (図 7)。

考 案

Kangawa, Matsuo により hANP はヒト心房より分離精製され、3 種類 (α, β, γ) のペプチドの 1 次構造まで解明された⁸⁾⁹⁾。さらにその生理作用についても、Na 利尿作用、血管拡張作用があり、レニン・アン

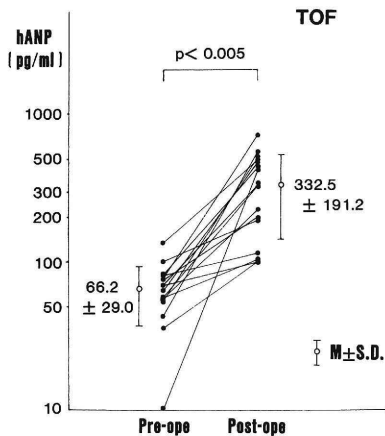


図7 ファロー四徴症における心内修復術前後の血中hANP濃度

ジオテンシン・アルドステロン系やバソプレッシンとも協調¹⁰⁾しながら、血圧や体液量のホメオスタシスを維持・コントロールする役割を持つことも明らかとなった。心不全患者では、重症度に応じて心房圧が上昇し血中hANP濃度が上昇¹¹⁾するため、血中hANP濃度が心不全重症度の指標となる¹²⁾¹³⁾と考えられている。しかし、血中hANP濃度の測定法は抽出操作を必要とするため煩雑であり⁷⁾、施設毎の基準値にも統一されたものがなく、小児循環器領域における血行動態との関連もまだ十分解明されていない。

血中hANP濃度の測定法には、Sagnella³⁾、Nakao⁴⁾、Ogawa⁵⁾、Naruse⁶⁾他様々な方法があるが、現在統一された方法はない。主流はSep pak cartridgeを用いた抽出法であるが、回収率にバラツキが多いことが問題である。例えばSagnella³⁾の方法では回収率は $83.9 \pm 8.3\%$ である。さらに、測定に用いられる抗血清の特異性による変動も加わる。このように測定法が異なるために正常値も10以下³⁾から130pg/ml前後⁵⁾⁶⁾と様々であるが、20~50pg/ml程度とする報告が多い。hANPが心不全重症度の指標として広く臨床に役立つためには、簡便で正確な測定法の確立が望まれる。

今回、著者らが血漿hANP濃度の測定に用いたキットは、血漿中からの抽出操作の必要がなく、直接法でhANPの定量が可能であるため、検査室においてルーチンに多検体の測定が可能となる利点を持つ。また、抽出操作を行わないため検体量も約1/10ですむ点も小児に有利である。非抽出法の場合は、血漿成分による測定系への干渉によりしばしば高値を示すことがあ

るとされている。しかし、本キットによる血中hANP濃度測定については既に、精度、再現性ともに優れることが確認されている⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。即ち、希釈曲線がほぼ原点を通る直線となり、抽出操作後に測定した血漿hANP値と良好な相関が認められている。問題は、心不全の重症度評価として妥当であるかどうかということである。本キットから得られた正常値は 54.0 ± 19.0 pg/mlであるが、この値は他の測定法から得られた正常値とほぼ同等である。新生児から学童まで年齢差は認められなかった。乳児期に高値を示すとする報告もあるが^{16)~18)}、新生児期から学童期まで年齢差はないとする報告¹⁹⁾もあり、一定していない。各報告とも対象数が限られているためと考えられ、新生児から1歳まではさらに詳細に検討する必要があると思われる。今回の結果は、本キットによる健常成人の正常値 57.1 ± 2.8 pg/ml¹⁵⁾とも差がなかった。

各心疾患の血中hANP濃度を比較すると、臨床的に高度の心不全を呈するTAPVRやCoAでは著しい高値を示し、VSDでは心不全を合併する例で有意に高値を呈していた。また、心室に対する圧負荷となるPSやASでは、臨床的に心不全があると考えられた重症例では高値を示し、軽症から中等症例では正常範囲であった。TOFでは心内修復術後には右室切開や残遺症による心不全を呈することが多いが、血中hANP濃度も術前に比べ術後では有意に高値を示し、臨床の評価とよく合致していた。こうした結果は他の報告¹⁶⁾¹⁷⁾²⁰⁾と同様であり、本法で測定した血中hANP濃度は各心疾患において心不全の重症度を適切に反映しており、心不全の重症度評価の良い指標になりうると考えられた。

また、ASDでは一般に小児期には心不全を呈することは稀であるとされており、今回の検討でも血中hANP濃度は多くは正常範囲であったが、高値を示す症例もあり、潜在性心不全の存在が示唆された。血中hANP濃度はこうした潜在性心不全の指標にもなりうると考えられた。

現在まで臨床的に容易に利用出来る定量的な心不全の指標はなかったが、血中hANP濃度は心不全の重症度評価としてきわめて有用であり、明らかな心房の圧負荷・量負荷がみられる心不全例のみでなく、潜在的な心負荷のある症例でも上昇しており、潜在性心不全の指標にもなりうると考えられた。本キットによる測定では、抗体の特異性という問題は解決していないが、抽出操作が不要であるため測定が容易で、測定誤差が

少なく、検体量が少量ですむという利点がある。心不全の指標として臨床応用に広く供するためには有利な点であると思われる。

文 献

- 1) Sugawara, A., Nakao, K., Morii, N., Sakamoto, M., Horii, S., Shimokura, M., Kiso, Y., Nishimura, K., Ban, T., Kihara, M., Yamori, Y., Kangawa, K., Matsuo, H. and Imura, H.: Significance of α -human atrial natriuretic polypeptide as a hormone in humans. Hypertension, 8(Suppl. I): I-151, 1986.
- 2) Dietz, J.R.: Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension. Am. J. Physiol., 247: R1093, 1984.
- 3) Sagnella, G.A., Markandu, N.D., Shore, A.C. and MacGregor, G.A.: Effects of changes in dietary sodium intake and saline infusion on immunoreactive natriuretic peptide in human plasma. Lancet, ii: 1208, 1985.
- 4) Nakao, K., Sugawara, A., Morii, N., Sakamoto, M., Suda, M., Soneda, J., Ban, T., Kihara, M., Yamori, Y., Shimokura, M., Kiso, Y. and Imura, H.: Radioimmunoassay for α -human and rat atrial natriuretic polypeptide. Biochem. Biophys. Res. Commun., 124: 815, 1984.
- 5) Ogawa, K., Ito, T., Hashimoto, H., Ito, Y., Ohno, O., Tsuboi, H., Takasu, N., Tanahashi, T. and Satake, T.: Plasma atrial natriuretic factor in congestive heart failure. Lancet, i: 106, 1986.
- 6) Naruse, M., Naruse, K., Obana, K., Kurimoto, F., Sakurai, H., Honda, T., Higashide, T., Demura, H., Inagami, T. and Shizume, K.: Immunoreactive α -human atrial natriuretic polypeptide in human plasma. Peptides, 7: 141, 1986.
- 7) 藤尾伸昭, 大橋昌夫, 名和田新, 加藤堅一, 井林博, 松尾寿之: hANP 測定用 RIA キット(栄研)の臨床的検討。ホルモンと臨床, 35: 509, 1987.
- 8) Kanagawa, K. and Matsuo, H.: Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). Biochem. Biophys. Res. Commun., 118: 131, 1984.
- 9) Kangawa, K., Fukuda, A. and Matsuo, H.: Structural identification of β - and γ -human atrial natriuretic polypeptides. Nature, 313: 397, 1985.
- 10) Laragh, J.H.: Atrial natriuretic hormone, The renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. New Engl. J. Med., 313: 1330, 1985.
- 11) Metzler, C.H., Lee, M.E., Thrasher, T.N. and Ramsay, D.J.: Increased right or left atrial pressure stimulates release of atrial natriuretic peptides in conscious dogs. Endocrinology, 119: 2396, 1986.
- 12) Tsunoda, K., Hodsman, G.P., Sumithran, E. and Johnston, C.I.: Atrial natriuretic peptide in chronic heart failure in the rat: A correlation with ventricular dysfunction. Circ. Res., 59: 256, 1986.
- 13) Hara, H., Ogihara, T., Shima, J., Saito, H., Rakugi, H., Inuma, K., Kumahara, Y. and Minamino, T.: Plasma atrial natriuretic peptide level as an index for the severity of congestive heart failure. Clin. Cardiol., 10: 437, 1987.
- 14) 加藤丈司, 久永修一, 中村 茂, 佐々木昭, 木田修, 児玉健二, 山本良高, 中田謙次郎: 心房性 Na 利尿ペプチド (ANP) 測定用 RIA キットの臨床応用。ホルモンと臨床, 35: 385, 1987.
- 15) 平田恭信, 石井富男, 松岡博昭, 杉本徳一郎, 福井一成, 杉本恒明, 宮田篤郎, 寒川賢治, 松尾寿之: Direct radioimmunoassay による血漿 α -hANP 濃度測定の臨床的検討。Prog. Med., 6: 3217, 1986.
- 16) 松岡 優, 倉橋佳英, 富松宏文, 宮尾益英, 山崎保寛, 西内 健, 斎藤史郎: 健康小児および先天性心疾患小児における心房性 Na 利尿ペプチドの血中濃度について。日児誌, 91: 3424, 1987.
- 17) 矢内 淳, 大山建司, 辻 敦敏, 太田正法, 駒井孝行, 隈部桂子, 加藤精彦, 浅石 澄: 健康小児および心疾患小児における心房性 Na 利尿ペプチドの検討。日小循誌, 4: 387, 1989.
- 18) 山崎士郎, 渡辺幹生, 柳 忠道, 辻 芳郎: 先天性心疾患小児のヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (α -hANP) 血中濃度と血行動態の相関についての検討。日小循誌, 2: 286, 1987.
- 19) 里方一郎, 内山 聖, 相川 務, 原錬太郎, 堺薫: 小児期における心房性ナトリウム利尿ペプチドの加齢に伴う変動。臨床病理, 35: 1159, 1987.
- 20) Kikuchi, K., Nishioka, K., Ueda, T., Shiomi, M., Takahashi, Y., Sugawara, A., Nakao, K., Imura, H., Mori, C. and Mikawa, H.: Relationship between plasma atrial natriuretic polypeptide concentration and hemodynamic measurements in children with congenital heart diseases. J. Pediatr., 111: 335, 1987.

Clinical Evaluation of a Direct Radioimmunoassay Method for Plasma Concentration of
Human Atrial Natriuretic Polypeptide
Part 1: The Correlation with the Severity of Congestive Heart Failure in
Children with Congenital Heart Disease

Kiyoshi Ogawa¹⁾, Ichirou Yano¹⁾, Masako Fujiwara¹⁾, Kenji Hoshino¹⁾,
Zuishou Kan¹⁾, Takashi Arai²⁾ and Hideaki Yamamoto²⁾
Division of Cardiology¹⁾ and Radiology²⁾, Saitama Children's Medical Center

The plasma concentration of immunoreactive atrial natriuretic polypeptide (hANP) was examined by direct radioimmunoassay method in 105 healthy children and 151 children with congenital heart disease.

The plasma hANP levels were 54.0 ± 19.0 pg/ml in all healthy children.

Significant increases in the plasma hANP level were found in patients with severe congestive heart failure (CHF) due to total anomalous pulmonary venous return, coarctation complex or critical aortic stenosis. The plasma hANP levels were not increased in patients with mild pulmonary stenosis or mild aortic stenosis. In the children with ventricular septal defect, those with CHF showed a significantly higher hANP level than without CHF ($p < 0.005$).

The plasma hANP levels examined by direct radioimmunoassay method were well correlated with the clinical severity of CHF.
