

原 著

hANP キットの基礎的, 臨床的検討

東京女子医科大学 ラジオアッセイ検査科 (主任: 出村 博教授)

テラサキ	カズヨ	ジビキ	カズコ	オダギリ	エミ
寺崎	和代	地曳	和子	小田	桐恵美
デムラ	レイコ	デムラ	ヒロシ		
出村	黎子	出村	博		

(受付 昭和63年6月3日)

Basic and Clinical Evaluation of Human Atrial Natriuretic
Polypeptide (hANP) RIA KitKazuyo TERASAKI, Kazuko JIBIKI, Emi ODAGIRI, Reiko DEMURA
and Hiroshi DEMURARadioassay Center (Director: Prof. Hiroshi DEMURA),
Tokyo Women's Medical College

We studied the fundamental and clinical usefulness of hANP radioimmunoassay (RIA) kit provided by Eiken, ICL. In the basic studies, inter- and intra-assay CV's were 5.8 and 7.9%, respectively. The dilution and recovery tests were satisfactory. The values of plasma hANP were decreased by repeated freezing and thawing or storing at 4°C for two weeks. There was no difference in hANP value between EDTA-trasyllol and EDTA plasma. Heparinized plasma gave higher value than those plasmas and serum. The levels of hANP in normal subjects were 34.7 ± 13.2 pg/ml (M \pm SD). In patients with chronic renal failure, hANP levels were high but decreased after dialysis. The hANP showed high values in some patients with nephrotic syndrome, pheochromocytoma, Pseudo bartter syndrome and diabetic coma. The hANP levels did not change by albumin loading test with and without lasix and angiotensin II test.

These results suggested that plasma hANP level increases with increased blood volume as observed in renal diseases and reflects abnormal states of body fluid, electrolytes and changes in hemodynamics together with renin-angiotensin-aldosterone system.

はじめに

心房細胞には分泌顆粒と考えられる特異的な顆粒の存在が知られていた。1981年, de Bold ら¹⁾によってラットの心房抽出物が強力な Na 利尿および降圧作用を発揮することが明らかにされ, 1984年, 寒川, 松尾ら²⁾はヒト心房組織内のこの物質が28個のアミノ酸よりなるポリペプチドであることを同定し, α -ヒト心房性 Na 利尿ペプチド (α -human atrial natriuretic polypeptide: α -hANP)と命名した。ヒト心房内には α -hANP のほかに α -hANP の N 末端が延長した126個のペプチドである γ -hANP が存在し, α -hANP の前

駆体であることが明らかにされている。またその他に α -hANP の逆平行 2 量体である β -hANP の存在も報告されている。これらの Na 利尿活性は α -hANP が最も強力であり以下 β -hANP, γ -hANP の順であるが, 末梢血液中の ANP の大部分が α -hANP であることが知られている。

今回我々は栄研化学社製の hANP 測定キットを使用する機会を得, その基礎的, 臨床的検討を行ったので報告する。

測定法

1. キットの組成

①抗 hANP ウサギ血清, ②¹²⁵I-標識 hANP, ③

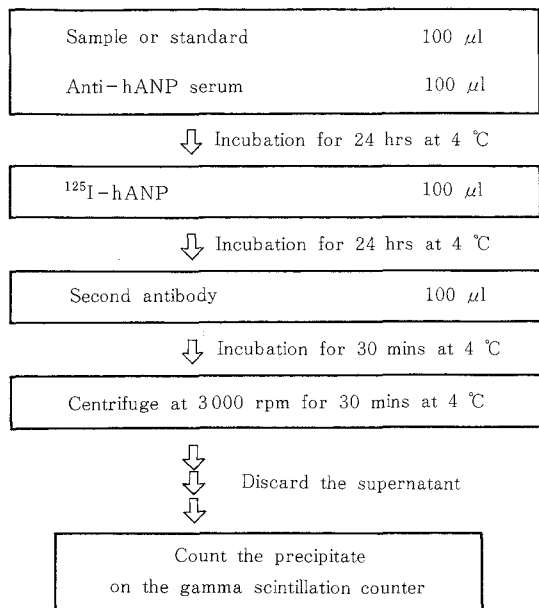


図1 操作法

標準 hANP 凍結乾燥品 (1,280pg/ml), ④抗ウサギ IgG ヤギ血清(第2抗体), ⑤0.1M リン酸緩衝液, ①~④は緩衝液で溶解後使用し, 標準 hANP は緩衝液で倍々希釈して使用した。

2. 操作法 (図1)

- 1) 試験管に標準 hANP または検体を100 μ l 入れる。
- 2) hANP 抗血清を100 μ l 加え, 混和後 4 °C で24時間インキュベーションする。
- 3) 125 I-標識 hANP 100 μ l 加え, 混和後 4 °C で24時間インキュベーションする。
- 4) 第2抗体100 μ l 加え混和後, 4 °C で30分インキュベーションする。
- 5) 3,000rpm 30分間遠心分離し, 上清を吸引除去後ガンマシンチレーションカウンターを用いて放射能を測定する。

対 象

対象は健常者30例(男性16例, 女性14例), 慢性糸球体腎炎3例, ネフローゼ症候群11例, 慢性腎不全19例, 原発性アルドステロン症4例, クッシング症候群2例, 褐色細胞腫10例, パーター症候群1例, 偽性パーター症候群6例, 特発性浮腫2例, 低レニン性低アルドステロン症1例, 尿管

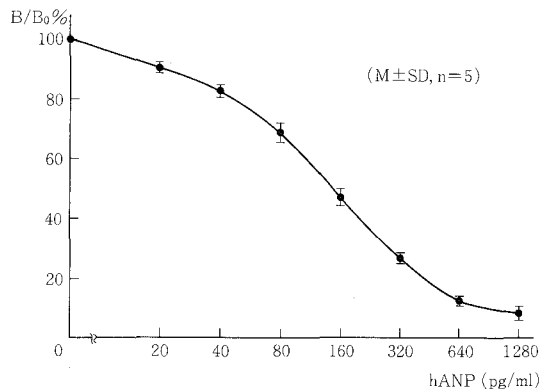


図2 標準曲線

表1 測定精度

Control serum	測定内再現性 (n=5)		測定間再現性 (n=8)	
	hANP M \pm SD (pg/ml)	CV %	hANP M \pm SD (pg/ml)	CV %
Low level	63.3 \pm 5.1	8.0	58.7 \pm 5.7	9.8
High level	227.6 \pm 7.9	3.5	219.7 \pm 13.0	5.9

性アシドーシス1例, 糖尿病性昏睡15例の計105例である。

有意差検定は Student's t test により行った。

結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線 (図2)

hANP 濃度が0~1,280pg/ml まで良好な標準曲線が得られた。最低検出感度は20pg/ml をさらに希釈し, その測定平均値の0pg/ml に対する有意差検定 ($p < 0.05$) により求めた結果, 10pg/ml であった。

2) 測定精度 (表1)

(1) 測定内再現性

2種のトラジロール加 EDTA 血漿凍結乾燥品を精製水で溶解し, 同一キットで5回測定した。低濃度の変動係数(CV)は8.0%, 高濃度の CV は 3.5% であった。

(2) 測定間再現性

2種の凍結乾燥品を測定毎に溶解し, 8回測定した際の低濃度の CV は9.8%, 高濃度の CV は 5.9% であった。

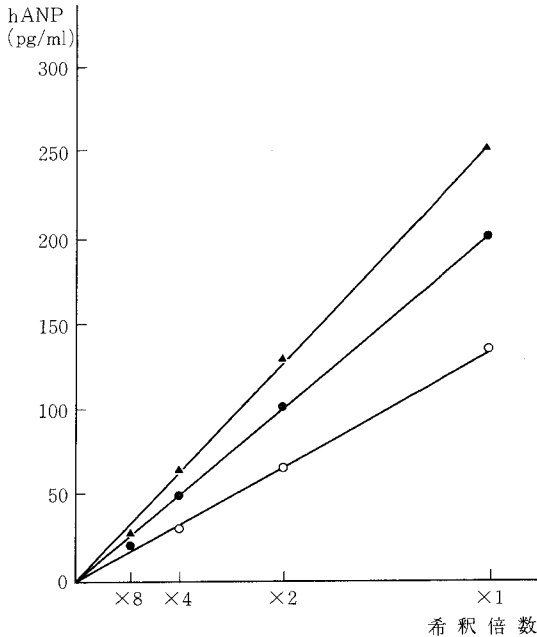


図3 希釈試験

表2 回収率試験

Control plasma	添加hANP	測定値	理論値	回収率	平均
	(pg/ml)		(%)		
Low level	0	29.5			
	20	47.4	49.5	95.8	
	40	59.0	69.5	84.9	
	80	95.5	109.5	87.2	
	160	168.2	189.5	88.8	89.2
High level	0	88.0			
	20	98.9	108.0	91.6	
	40	126.9	128.0	99.1	
	80	173.2	268.0	103.1	
	160	235.1	248.0	94.8	97.2

3) 希釈試験 (図3)

3種の検体を緩衝液にて2~8倍に希釈した。希釈曲線は原点を通る良好な直線を示した。

4) 回収率試験 (表2)

低濃度、高濃度のコントロール血漿に既知濃度のhANPを添加した。回収率の平均は各々89.2%、97.2%であった。

5) 抗hANP抗血清の特異性 (表3)

本抗血清は α -hANPに対し100%、 β -hANPに対し90%の交叉率を示した。またhANP(1~26)は<0.1%の低い交叉率であるのに対しhANP

表3 交叉試験

Peptide	Cross-reactivity(%)
α -h-ANP	100
β -h-ANP	90
α -r-ANP	65
h-ANP(1-26)	< 0.1
ANP(13-28)	87
ANP(18-28)	87
r-ANP(5-28) (Atriopeptin III)	87
r-ANP(5-27) (Atriopeptin II)	3.8
r-ANP(5-25) (Atriopeptin I)	< 0.1

(13~28), hANP(18~28)は87%の交叉率を示し、C端を認識していると考えられた。

(深谷洋一ほか: 栄研化学株式会社資料参照)

6) hANP値に与える抗凝固剤の影響 (図4)

健常者30例の血清、ヘパリン血漿、EDTA血漿、トラジロール加EDTA血漿の測定を比較した。それぞれの平均(M \pm SD)は46.4 \pm 17.3pg/ml, 59.7 \pm 12.9pg/ml, 37.9 \pm 11.1pg/ml, 34.7 \pm 13.2pg/mlであった。EDTA血漿とトラジロール加EDTA血漿では有意差(p<0.05)を認めなかったが、血清は他より幅広く分布し、ヘパリン血漿は高めに測定され、EDTA血漿とトラジロール加EDTA血漿との間に有意差(p<0.05)を認めた。

7) 検体保存の影響 (図5)

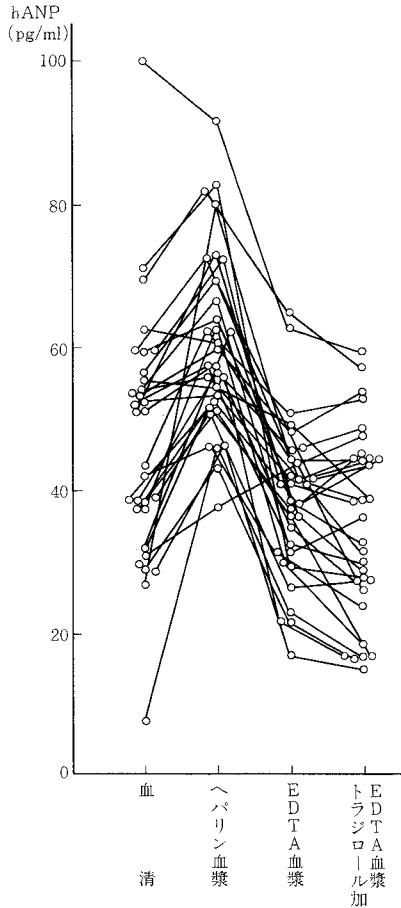
(1) 2種のコントロール用凍結乾燥品を精製水で溶解した直後の値を100%とし、凍結融解を1週間毎に1~4回繰り返したときの値を%で示した。低濃度コントロール血漿は1回目は81.9%から4回目に77.7%に、高濃度コントロール血漿は91.2%から74.3%と共に低下した。

(2) 同様にコントロール血漿を4℃で2、4週間保存後の値を%で示した。低濃度コントロール血漿は2週目84.4%から4週目には74.9%に、高濃度コントロール血漿は51.2%から40.0%に低下した。

2. 臨床的検討

1) 基礎値 (図6)

(1) 正常値



実線(○)は同一サンプル
図4 抗凝固剤の影響

健常成人30名の安静臥位30分後のトラジロール加EDTA血漿のhANP値は平均(M±SD) 34.7 ± 13.2 pg/mlで、正常範囲は8.3~61.1 pg/ml (M±2SD)と設定した。

(2) 各種疾患における血中hANP値

腎疾患はトラジロール加EDTA血漿により測定したが、内分泌疾患はEDTA血漿、糖尿病性昏睡についてはヘパリン血漿による測定値のため、図に各々の正常範囲を斜線で示した。

慢性糸球体腎炎3例では27.6~66.6 pg/ml, ネフローゼ症候群11例では61.6~35.9 pg/ml, 慢性腎不全19例では178.3±71.3 pg/ml, 特発性浮腫2例では12.1, 36.1 pg/ml, 原発性アルドステロン症4例では21.1~66.6 pg/ml, クッシング症候群2

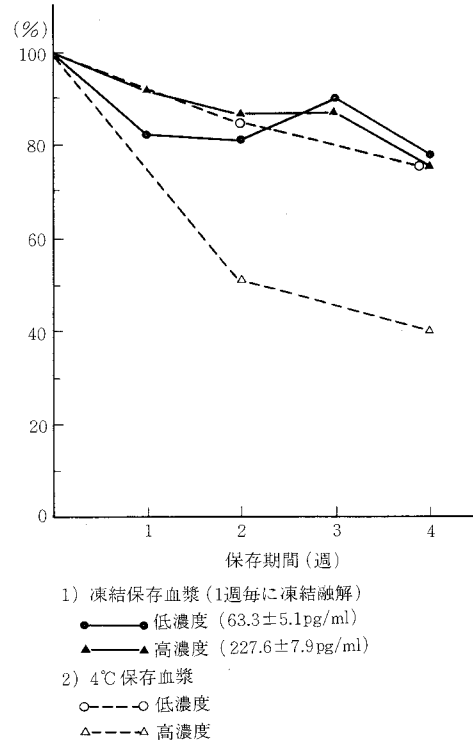


図5 検体保存の影響

例では29.8, 38.8 pg/ml, 褐色細胞腫10例では 56.3 ± 27.1 pg/ml, パーター症候群1例では27.0 pg/ml, 偽性パーター症候群6例では 61.5 ± 31.6 pg/ml, 糖尿病性昏睡15例では 82.6 ± 70.6 pg/mlであった。

(3) 透析, 非透析慢性腎不全患者の血中hANP値(図7)

hANP値は非透析慢性腎不全10例では 158.5 ± 74.7 pg/ml, 透析慢性腎不全9例では透析前 200.4 ± 64.3 pg/ml, 透析後 120.0 ± 28.3 と, 透析後で有意に低下したが, 非透析, 透析慢性腎不全の間に有意差を認めなかった。

2) 各種負荷試験における血中hANP値

(1) 立位負荷試験におけるhANP, 血漿レニン活性(PRA), 血漿アルドステロン濃度(PAC)値(図8)

健常者18例のhANP値の前値(安静30分後)は平均 45.0 ± 10.7 pg/ml, 立位1時間後は 51.4 ± 11.6 pg/mlで増加傾向を示す例が多かったが有

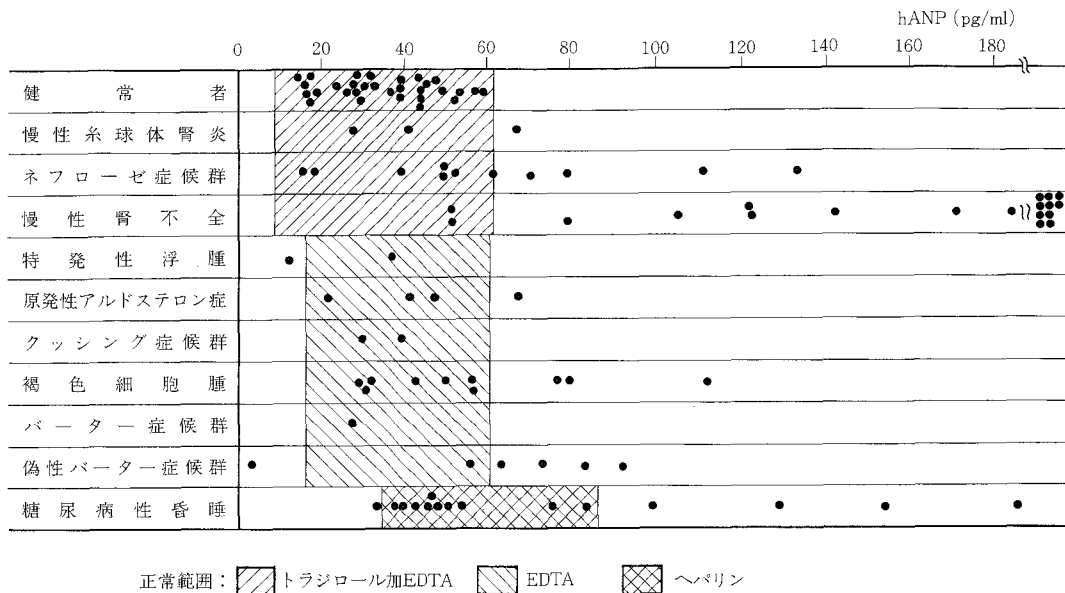


図6 各種疾患における血中 hANP 値

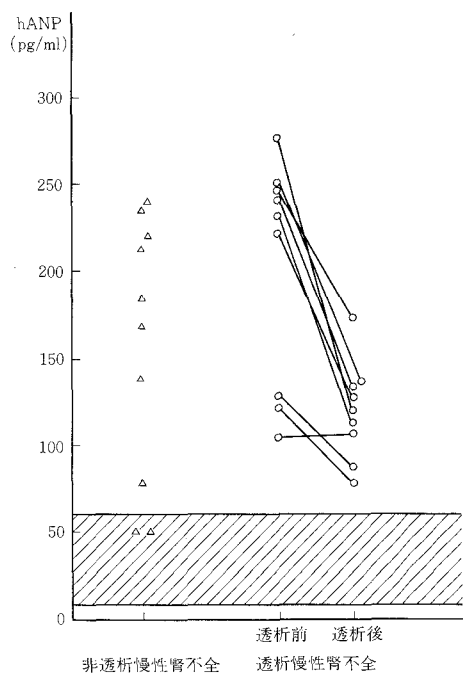


図7 非透析および透析慢性腎不全における血中 hANP 値

意差は認められなかった。PRA は 1.2 ± 0.5 pg/ml から 2.6 ± 1.1 pg/ml と全例で増加、PAC は 11.4 ± 5.6 pg/ml から 15.8 ± 6.0 pg/ml と1例を除き増

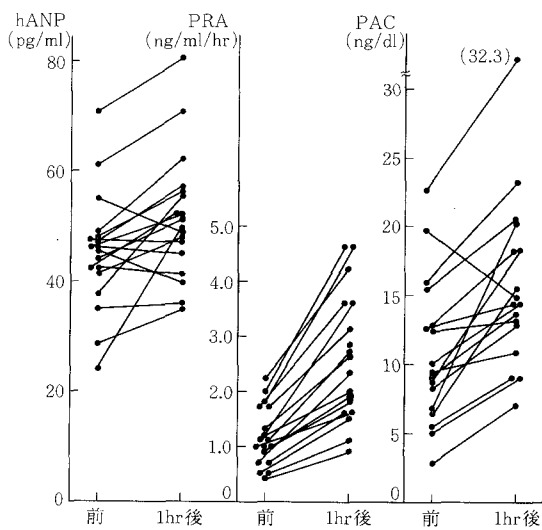


図8 健常者の立位負荷における hANP, PRA, PAC 値

加した。

(2) ラシックス負荷, アルブミン負荷, アルブミン+ラシックス負荷試験における hANP 値(図9)

ネフローゼ症候群3例にラシックス80mg, アルブミン25g を経口投与した。

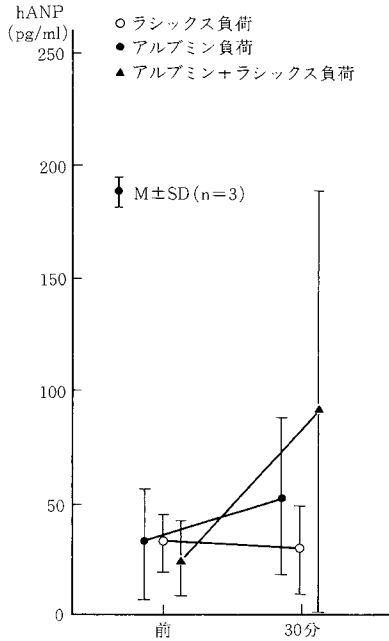


図9 ネフローゼ症候群のラシックス負荷, アルブミン負荷, アルブミン+ラシックス負荷におけるhANP値

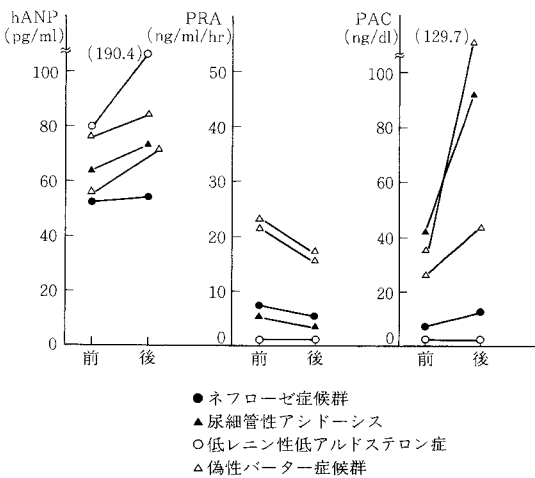


図10 アンジオテンシンII負荷試験

hANP値はラシックス負荷では不変で, アルブミン負荷, アルブミン+ラシックス負荷には増加傾向を示した。

(3) アンジオテンシンII (AII) 投与試験におけるhANP, PRA, PAC値 (図10)

AII 0.5mgを5%グルコース500mlに溶解後点

滴静注し, 拡張期血圧が20mmHg上昇する速度で30分間注入した。

低レニン性低アルドステロン症1例では, PRA, PAC値は無反応であったが, hANP値は増加反応を示した。ネフローゼ症候群1例, 尿管性アシドーシス1例, 偽性バーター症候群2例ではAIIによりPRA値は抑制されPAC, hANP値は増加反応を示した。

考 察

ANPはNa利尿作用と血管拡張作用に加え, レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(R-A-A系)や交感神経系など昇圧系の体液性因子にも抑制的に働いて降圧作用を有する。また, ANPは心房圧の上昇やAII, カテコールアミンなどにより分泌促進されるため心疾患はもとより, 腎疾患, 内分泌疾患におけるhANPの動態についても検討がなされている。

基礎的検討の結果, 本キットの最低検出感度は10pg/mlで, 希釈試験, 回収率試験は共に良好であった。凍結乾燥品を融解して測定した場合, 測定内および測定間再現性は良好であった。しかし, 凍結融解の繰り返しにより測定値の低下がみられた。また4℃で保存した場合は凍結融解よりも低下は著しかった。ANPは血中の白血球および血小板に含まれるプロテアーゼにより分解されるためトラジロールの添加により反応が阻害されることが報告³⁾されており, トラジロール加EDTA血漿がhANPの測定に使用されている。EDTA血漿はトラジロール加EDTA血漿と有意差を認めなかったが, ヘパリン血漿は高値に測定され, 血清もヘパリン血漿よりやや低値であるが変動幅が大きく, ヘパリンあるいは血漿, 血清成分の測定系やhANPの安定性への影響が考えられた。以上よりヘパリン血漿と血清は本測定系には適当でないと考えられた。

臨床的検討では安静臥位での健常人のhANP値は 34.7 ± 13.2 pg/ml ($M \pm SD$)と他の抽出法^{4)~6)}および直接法⁷⁾の報告とほぼ一致していた。しかし, 立位負荷ではRPA, PAC同様むしろ増加傾向を示した。立位による静脈血還流量の減少は, 心拍出量の減少, 動脈圧の減少として圧受容体に

よって感受され、R-A-A系の活性化が進み、昇圧および体液保持の方向に調節が進行する。したがってhANPは立位により一旦低下すると考えられている。他の報告⁹⁾では、hANPは立位5～10分に低下後、上昇し30分後に前値に戻っている。今回の立位1時間後のhANPの増加はR-A-A系の亢進の結果、アンジオテンシンやカテコールアミンの増加を介した可能性が考えられた。

慢性糸球体腎炎およびネフローゼ症候群のhANP値は正常から高値へ広く分布した。ネフローゼ症候群では低アルブミン血漿を来すため血漿膠質浸透圧が低下し、浮腫と循環血漿量の低下が生じ、hANPの低下を引き起こすことが考えられる。しかし、一部の症例でhANPはむしろ高値を示した。同時に測定したPRA、PAC値はいずれも低値であったことから循環血漿量が逆に増加した状態もあると考えられた。慢性腎不全では2例を除き高値を示した。慢性腎不全におけるhANP高値は多くの報告⁹⁾¹⁰⁾があり、これは主としてGFRの減少に起因する体液量の増加がANPの分泌を促進していると考えられている。慢性腎不全の病期が進行するにつれてGFRの低下が進み透析導入に至るため、非透析例の中には正常値を示す例もあると考えられた。透析によるhANP値の低下は、循環血漿量の減少によると考えられた。

原発性アルドステロン症では1例を除きhANP値は正常範囲内であった。クッシング症候群においても正常値を示したが、アルドステロンおよびコルチゾールの鉱質コルチコイド作用による体液量の増加により、これらの疾患でhANP値が増加しているという報告¹¹⁾もある。褐色細胞腫では正常値または高値を示した。本症では循環血漿量の低下によりR-A-A系は一般に刺激されている。アドレナリンがrANP分泌を増加させるという報告¹²⁾もあり、ANPはカテコラミンによる血管収縮作用や心拍数、心拍出量増加作用を抑制する方向に働くと考えられ、交感神経系の機能亢進がANP分泌に促進的に作用している可能性があると考えられた。

バーター症候群では血漿ANP値は正常値、偽性バーター症候群では低値～高値を示した。本病

態のNa喪失はhANP分泌には抑制的に働くと考えられるが、R-A-A系が亢進しているため血漿および血中Naは正常値を示し、hANP値も種々の程度にこれらの影響を受けていると考えられた。糖尿病性昏睡のhANP値は正常から高値へ広く分布した。糖尿病性昏睡では、高血糖により血漿浸透圧が上昇するため、循環血漿量が増加しhANPが高値を示す例があると考えられた。

ネフローゼ症候群のラシックス負荷はその利尿作用により、循環血漿量の減少と共に血漿hANP値を低下させ、アルブミン負荷では血漿膠質浸透圧の上昇によりhANP値を増加させると考えられた。アルブミン+ラシックス負荷では血漿膠質浸透圧を高め、hANPの分泌が亢進し、利尿効果をより高める方向に作用すると考えられる。

AII負荷試験においてPRAやPACの変化にかかわらず、いずれもhANP値が増加したことはAIIが直接にhANP分泌を刺激した可能性が示唆された。

まとめ

今回、基礎的検討においては測定精度、希釈、回収率試験で満足すべき結果が得られた。臨床的検討においては、循環血漿量が増加する状態、例えば慢性腎不全、ネフローゼ症候群のGFR低下時、糖尿病性昏睡の初期などにhANP値が高値を示すことから、これらの疾患の循環血漿量の変動の目安になること、また種々の内分泌疾患でもR-A-A系の変化と共に水、電解質の異常や血行動態の変化を反映することが考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究に関して御助言いただきました内分泌内科の成瀬光栄先生に深謝致します。なおhANP測定キットを提供していただいた柴研ICLに感謝いたします。

本研究の一部は厚生省特定疾患「ステロイドホルモン異常症研究班」の研究費によった。

文 献

- 1) de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT et al: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28: 89-94, 1981
- 2) Kangawa K, Matsuo H: Purification and

- complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 118: 131—139, 1984
- 3) **Nishiuchi T, Saito H, Saito S et al**: Radioimmunoassay for atrial natriuretic peptide. *Clin Chim Acta* 159: 45—57, 1986
 - 4) **Sugawara A, Nakao K, Imura H et al**: α -human atrial natriuretic polypeptide is released from the heart and circulates in the body. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 439—446, 1985
 - 5) **Hartter E, Woloszczuk W, Stummoll HK**: Radioimmunoassay of atrial natriuretic peptides in human plasma. *Clin Chem* 32: 441—445, 1986
 - 6) **Yamaji T, Ishibashi M, Takaku F**: Atrial natriuretic factor in human blood. *J Clin Invest* 76: 1705—1709, 1985
 - 7) **Marumo F, Sakamoto H, Kawakami M et al**: A highly sensitive radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide (ANP) in human plasma and urine. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 231—236, 1986
 - 8) **Ogihara T, Shima J, Matsuo H et al**: Changes in human plasma atrial natriuretic polypeptide concentration in normal subjects during passive leg raising and whole body tilting. *Clin Sci* 71: 147—150, 1986
 - 9) **Hasegawa K, Matsushita Y, Inoue T et al**: Plasma levels of atrial natriuretic peptide in patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 819—822, 1986
 - 10) **Anderson JV, Raine AEG, Poroudler A et al**: Effect of haemodialysis on plasma concentrations of atrial natriuretic peptide in adult patients with chronic renal failure. *J Endocrinol* 110: 193—196, 1986
 - 11) 山路 徹, 石橋みゆき: 副腎ホルモン産生異常症における心房性ナトリウム利尿ペプチドの血中動態について. 厚生省特定疾患『副腎ホルモン産生異常症』調査研究班, 昭和61年度研究報告書, 117—125, 1987.
 - 12) **Sonnenberg H, Veress AT**: Cellular mechanism of release of atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 124: 443—449, 1984