

論 文 内 容 要 旨

序 論

心房組織から分離精製されたAtrial Natriuretic Peptide (ANP)は強力なナトリウム利尿活性および平滑筋弛緩活性を有し、体液量および血圧の恒常性維持に関連するホルモンと考えられている。ANPの測定に関しては最近各施設で始められたばかりであり、これまでのところ、血中濃度は容量負荷によって増加し、また発作性心房性頻拍症および心不全において高値であるといわれている。そこで我々はANPの特異的なRadioimmunoassay (RIA)を開発し、ANPの病態生理学的な役割を明らかにするために、正常および各種の疾患において血中ANPの動態を検討した。

対 象 と 方 法

RIAは非平衡法で行い、BF分離は二抗体法とし、assay bufferに0.1M phosphate buffer, pH 7.7を用いた。抗血清はglutaraldehydeを用いて合成ヒトANP(1-28)(Peninsula Laboratories社)とbovine tyroglobulinを結合し家兎に反復免疫して得たもので最終希釈倍率9000倍で使用、また¹²⁵I-ANPはクロラミンT法を用いて作製した。血漿からのANP抽出にSep-Pak C₁₈を用いた。対象は健常者28名(男18名,女10名),うっ血性心不全8名(NYHA 3度4名, NYHA 4度4名),心拍数100/min以下の心房細動6名,ペースメーカーを装着した完全房室ブロック2名,拘束性または閉塞性肺疾患11名,クレアチニンクリアランス(C_{cr})が20ml/min以下の慢性腎不全11名,慢性糸球体腎炎13名,浮腫を伴うネフローゼ症候群5名,未治療の本態性高血圧6名,慢性肝炎または腹水を伴う肝硬変5名および脳血管障害9名とし,早朝安静空腹時に末梢静脈からヘパリン加採血した。また平均4時間透析を週3回施行している維持血液透析患者11名において透析前後に採血,さらに6名において透析開始直後にダイアライザーの流入側および流出側の血液および透析液を採取した(血液流量120-200ml/min,透析液流量500ml/min)。健常者8名で7,14および21時に,また5名で連続4日間7時に採血した。採血1ml当たりaprotinin 2500 U, EDTA 1mgを加え,血漿分離後-20℃に保存した。Sephadex G-50 column(0.9×56cm)にて正常血漿30ml,透析患者血漿26mlおよび透析液500mlの抽出物のゲルクロマトグラフィーを行なった。前記の腎疾患29名ではC_{cr}を測定した。

結 果

本RIA系の標準曲線は比較的急峻であり感度は2.5 pg/tubeと鋭敏であり,血漿抽出物の希

積曲線は標準曲線と平行した。ヒト ANP (7-28), ヒト Met (0)¹² ANP (1-28) およびラット ANP (1-28) と 100% の交叉活性を示したが 他の異種ペプチドとの交叉活性はなかった。同一血漿による withinassay および betweenassay の変動係数はそれぞれ 6.4% (n=9), 10.5% (n=6) と比較的良好な再現性を示し、回収率は平均 72% (n=6) であった。7, 14 および 21 時の、また連続 4 日間 7 時の血中 ANP 濃度に有意差はなかった。健常者では血中 ANP 濃度は 70 ± 32 pg/ml (mean \pm SD) であり、男女間に有意差はなかった。うっ血性心不全では 394 ± 260 pg/ml と高く、NYHA 4 度はより高値を示した。慢性腎不全では 219 ± 86 pg/ml と高値を示し、腎疾患においては C cr と血中 ANP 濃度の間には有意な負の相関が認められた ($r = -0.812$, $p < 0.001$)。心房細動, 完全房室ブロック, 肺疾患, 慢性糸球体腎炎, ネフローゼ症候群, 本態性高血圧, 肝疾患および脳血管障害においては血中 ANP 濃度は健常者と有意差はなかった。血液透析患者では透析前値は高く (433 ± 166 pg/ml), 透析後に全例下降した (204 ± 92 pg/ml)。ダイアライザー流入側の血中 ANP 濃度は 414 ± 104 pg/ml であったが流出側では 325 ± 80 pg/ml に減少した。透析液では流入側に ANP は検出されなかったが流出側には 21 ± 13 pg/ml の濃度で認められた。ゲルクロマトグラフィーにて正常血漿では小さなピークに続いて合成ヒト ANP (1-28) の溶出ピークと一致する大きなピークが認められた。透析患者血漿では正常者血漿の溶出パターンとほぼ同じであったが、透析液ではこの大きなピークのあとに小さなピークが認められた。

結 論 と 考 察

本 R I A 系は特異的であり感度, 再現性および回収率が良好であり血中 ANP の定量測定を可能とした。ゲルクロマトグラフィーの結果から血中では主として ANP (1-28) として存在すると考えられた。血中 ANP 濃度に有意な日内変動および日差変動は認められなかった。病態では心不全および腎不全において血中 ANP 濃度は高値であり、しかも心機能障害および腎機能障害の強いものほど高値を示した。血液透析患者では著明な高値を示し、透析によってかなりの ANP が血中から透析液へ除去された。以上のことから循環血漿量の増大する病態において ANP 分泌が亢進すると考えられ、体液量の調節機構に ANP が何らかの関連を有することが推測された。また腎臓が ANP の代謝に一部関与することが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide, 以下ANP) は最近発見された新しいホルモンであり, 強力な利尿効果を有するばかりでなく, 直接血管平滑筋にも働らき, これを弛緩させる作用もある。従って, ANPは, 循環調節, 体液調節, 血圧調節等において重要な生理的機能を担っているものと思われる。

本論文の著者, 野月満は, ANPの体内での働きを研究するため, 本ホルモンのラジオイムノアセイを検討し, ほぼ満足すべき方法の開発に成功した。彼はこのアセイ法を用いて患者流血中のANPを測定し, ある種の疾患ではANPが増加していることを確認した。

野月は先ず合成ヒトANP (1~28) をウシサイログロブリンと結合し, これを家兎に反復免疫してANP抗体を作製した。ヒト血漿のANPを抽出するのにSep-Pak C₁₈を用いた。

野月の開発したアセイ法は2.5pg/tubeまで測定できる感度を有し, 異種ペプチドとは交叉反応を示さず, 回収率は72%, 再現性も十分に高かった。本法による健常人末梢血漿中ANP濃度は 70 ± 32 pg/mlであり, 男女差はなかった。

うつ血性心不全患者では 394 ± 260 pg/mlと高く, うつ血症状の強いものほどANP濃度も高かった。慢性腎不全患者では 219 ± 86 pg/mlと高値を示し, 腎不全の高度のものほど血中ANPも高い傾向を示した。血液透析を受けている腎不全患者では, 血中ANPは透析前に高く, 透析後に低下することが確かめられた。また, ANPの一部が透析膜を通して透析液中に移行することも確認された。

患者血漿中のANPをゲルクロマトグラフィーによって分析すると, 大部分が合成ヒトANP (1~28) と一致した。

野月満のこの研究は, 新しいホルモンであるANPのラジオイムノアセイを確立したものであり, ANP研究の有力な手段を開発したものである。彼は本法を用いて, 心不全や腎不全におけるANPの関与を明らかにした。この方法は今後ひろく臨床研究に応用されるものと思われる。この研究は十分に学位に値するものと考える。