

ELISA による犬の血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム 利尿ペプチド濃度測定

西飯直仁¹⁾ 高島 諭^{1)†} 松原達也¹⁾ 小島正章²⁾
星野恵美²⁾ 蜂巢達之²⁾ 北川 均¹⁾

1) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

2) ㈱シバヤギ (〒377-0007 渋川市石原1062-1)

(2014年6月26日受付・2014年9月26日受理)

要 約

犬の血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proANP) 濃度測定 ELISA キットの測定精度を評価するとともに、正常犬 23 頭、僧帽弁閉鎖不全症 (MR) の犬 30 頭、フィラリア症の犬 4 頭において血漿 NT-proANP 濃度を測定した。同時再現性及び日差再現性試験における変動係数はそれぞれ 2.0~2.5% 及び 0.4~2.6% であり、添加回収試験での回収率は 98~103% であった。希釈により良好な直線性が得られた。血漿 NT-proANP 濃度は、MR の犬 ($426.9 \pm 225.7 \text{ pg/ml}$) 及びフィラリア症の犬 ($753.3 \pm 321.7 \text{ pg/ml}$) では、正常犬 ($73.9 \pm 22.4 \text{ pg/ml}$) と比べて有意に高値であった。本 NT-proANP 濃度測定系は犬の心疾患の診断に有用である可能性がある。

——キーワード：心疾患，犬，NT-proANP.

-----日獣会誌 68, 68~72 (2015)

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は心房内圧の上昇によって分泌が刺激されるため、犬において心疾患の臨床マーカーとして利用される [1, 2]。しかし ANP は血中での半減期が 10 分と非常に短く [3]、正確な測定が困難であるという欠点がある。N 末端プロ ANP (NT-proANP) はプロホルモン (proANP) から ANP が産生される際に切り離される 98 アミノ酸からなるペプチドであり、ANP と等モルの分子が血中に分泌される [4]。NT-proANP の血中半減期は 45 分と ANP よりも長い [3]、NT-proANP を測定することで ANP の分泌量について、より安定して評価することが可能である。実際に人において NT-proANP が心疾患の診断に有用と報告されている [5]。

過去に犬において血中 NT-proANP 濃度を測定した研究はあるが [6-12]、いずれも人用の測定系を用いている。しかし、人と犬における NT-proANP のアミノ酸配列の相同性は 86.7% に過ぎず [13]、人用の測定系では測定感度の不足により、犬では明らかに再現性が得られない (未発表データ) ものがあるなど、問題があった。そのため今回我々は、犬 NT-proANP を用いて開発された犬特異的 NT-proANP ELISA キットの測定精

度について検討するとともに、正常な犬及び心疾患を持つ犬において血中 NT-proANP 濃度を測定した。

材料及び方法

NT-proANP の測定には犬用 NT-proANP 測定キット (イヌ NT-proANP ELISA KIT, ㈱シバヤギ, 群馬) を用いた。このキットはペプチド合成した犬 NT-proANP を標準物質とし、2 種類の抗犬 NT-proANP モノクローナル抗体を使用したサンドイッチ ELISA を用いている。この ELISA 測定系について、以下のようなアッセイ・バリデーションを実施した。同時再現性試験では正常犬及び僧帽弁閉鎖不全症 (MR) 犬各 1 検体において 6 測定を同時に行い、変動係数 (CV) を算出した。日差再現性試験では正常犬 1 検体及び MR 犬 2 検体において 4 回の測定を行い、CV を算出した。添加回収試験では正常犬 2 検体において 25, 50, 75 pg/ml または 100, 200, 300 pg/ml の犬 NT-proANP を添加した後に NT-proANP 濃度を測定して回収率を算出した。直線性試験では MR 犬 2 検体においてそれぞれ 4 段階に希釈し、NT-proANP 濃度を測定した。検量線より定量限界について、以下の式を用いて算出した。定量限界 =

† 連絡責任者：高島 諭 (岐阜大学応用生物科学部)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2950 E-mail: s0takash@gmail.com

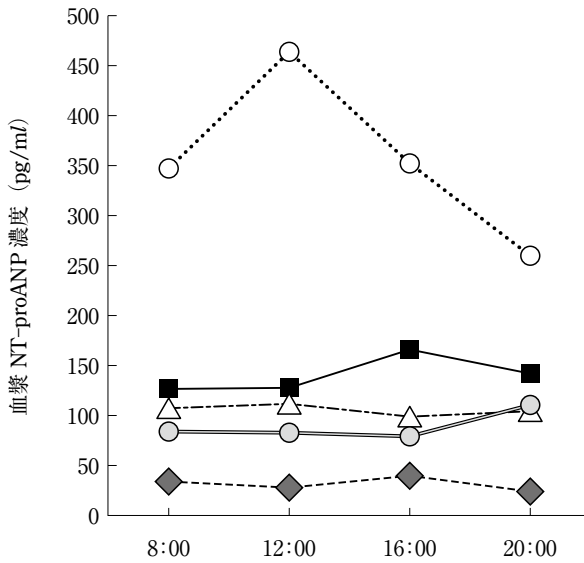


図1 正常犬の血漿 NT-proANP 濃度の日内変動

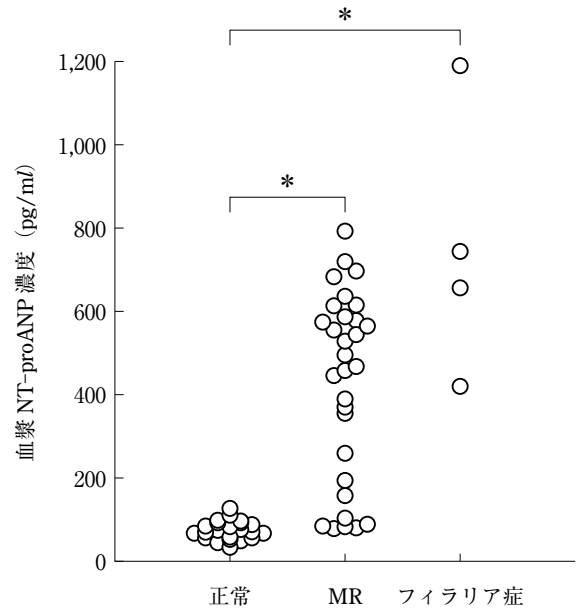


図2 正常犬、僧帽弁閉鎖不全症及びフィラリア症の犬の血漿 NT-proANP 濃度 (* : $P < 0.01$)

10 σ /S (ただし σ : レスポンスの標準偏差, S : 検量線の傾き).

臨床的に健康な犬 (正常群, 23 頭) と, 臨床症状, 身体検査, X 線検査, 超音波検査, フィラリア抗原検査により MR (MR 群, 30 頭) 及びフィラリア症 (フィラリア症群, 4 頭) と診断された犬の血液を採取した. International Small Animal Cardiac Heart Council (ISACHC) の分類 [14] は, MR 群ではクラス I が 1 頭, クラス II が 25 頭, クラス III a 及び III b が各 2 頭であり, フィラリア症群ではクラス II が 4 頭であった. 日内変動の評価では 5 頭の健康な犬を絶食し, 8:00, 12:00, 16:00, 20:00 に採血した. 食餌が NT-proANP 濃度に与える影響について評価するため, 5 頭の健康な犬において 15 時間の絶食後及び給餌から 3 時間後に採血した. 血液サンプルはアプロチニン加 EDTA 採血管に入れ, 速やかに血漿を冷却遠心分離して NT-proANP の測定まで -80°C で冷凍保存した.

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した. 群間比較に関する解析及び ROC 解析には Excel 2011 または R version 3.0.2 を用いた. MR 群, フィラリア群と正常群との測定値の比較には一元配置分散分析及びダネット法を用いた. 日内変動の評価では二元配置分散分析を用いた. 給餌の影響の評価では一標本 t 検定を用いた. ROC 解析では MR 群とフィラリア症群をあわせた心疾患群と, 正常群との鑑別について解析した. カットオフ値は, ROC 曲線における左上隅からの距離及び Youden Index [15] を基に算出し, 感度及び特異度を算出した. $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した.

成 績

NT-proANP の平均濃度が 62.1 及び 311.0pg/ml の 2 検体において, 同時再現性試験の CV 値はそれぞれ 2.0 及び 2.5% であった. NT-proANP の平均濃度が 91.7, 149.0 及び 309.0pg/ml の 3 検体において, 日差再現性試験の CV 値はそれぞれ 2.6, 0.4 及び 2.0% であった. NT-proANP 濃度が 44.5 及び 77.8pg/ml の検体においてそれぞれ 25~75pg/ml 及び 100~300pg/ml の NT-proANP を添加したところ, それぞれ 97.6~99.2% 及び 98.2~103% の回収率が得られた. 直線性試験では, NT-proANP 濃度が 387pg/ml 及び 117pg/ml の 2 検体において希釈により良好な直線性が得られた ($y = 380.9x + 0.49$, $R = 0.9999$ 及び $y = 111.4x + 1.24$, $R = 0.9992$). 定量限界は 6.55pg/ml であった.

日内変動の評価では, 8:00~20:00 の間に, 統計学的に有意な変動はみられなかった (図 1). ただし他の個体よりも血漿 NT-proANP 濃度が高かった 1 頭では約 200pg/ml の変動がみられた. 食前と食後の血漿 NT-proANP 濃度に有意な差はみられなかった (それぞれ 86.1 ± 29.5 及び 85.9 ± 29.9 pg/ml).

血漿 NT-proANP 濃度は, MR 群 (426.9 ± 225.7 pg/ml) 及びフィラリア症群 (753.3 ± 321.7 pg/ml) では正常群 (73.9 ± 22.4 pg/ml) よりも高かった ($P < 0.01$) (図 2). ROC 解析を行ったところ, ROC 曲線下面積は 0.943 であった (図 3). ROC 曲線における左上隅からの距離による方法では, カットオフ値は 95.6pg/ml, 感度は 85.3%, 特異度は 91.3% であり, Youden Index による方法では, カットオフ値は 127pg/ml, 感度は 82.4%,

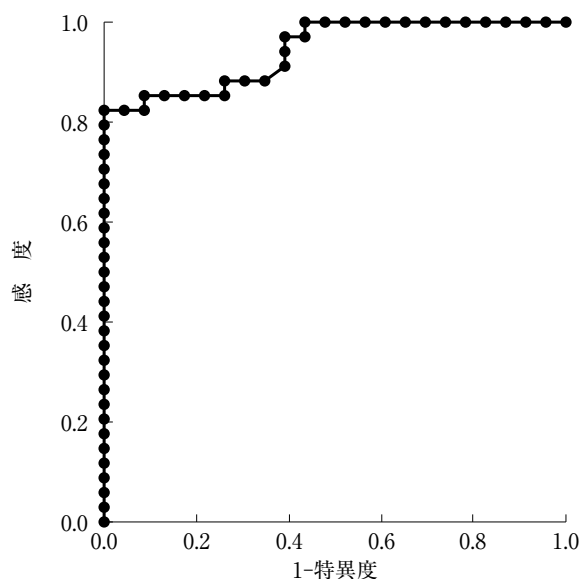


図3 血漿 NT-proANP 濃度を用いた心疾患犬 (n=34) と正常犬 (n=23) の鑑別に関する ROC 曲線

特異度は 100%であった。

考 察

本研究の犬 NT-proANP 測定キットは非常に良好な精度及び再現性を示し、添加回収試験及び直線性試験などからも、犬血漿における NT-proANP 濃度測定系としての妥当性が証明された。

採血時刻や給餌によって、NT-proANP 濃度に明らかな変化はみられなかった。これは、日内変動は観察されないとする人 [16, 17] 及びヤギ [18] での報告と一致する。

いっぽうラットでは夜間に血中 ANP 濃度が高く [19, 20]、人においても明け方に血中 ANP 濃度がピークを迎えるという報告がある [21-23]。このような日内変動の原因として夜間の臥位 (人) や飲水 (ラット) などが考察されている。本研究では夜間の血漿 NT-proANP 濃度を測定しておらず、夜間の変動については評価することができなかった。しかし少なくとも日中の変動は少なく、採血時刻が血漿 NT-proANP 濃度に影響しないことが示唆された。ただし血漿 NT-proANP 濃度が高値を示した 1 頭では若干の変動が観察されたことから、血漿 NT-proANP 濃度が高い個体においてはある程度の日内変動が存在する可能性が否定できなかった。変動の原因は不明であるが、人やラットと同様に姿勢や飲水が影響している可能性も考えられた。

血漿 NT-proANP 濃度は MR 及びフィラリア症の犬で著明に高値であり、血漿 NT-proANP 濃度測定がこれらの心疾患の診断に有用であることが示唆された。血漿 ANP 濃度による心疾患 (ISACHC クラス II) の診断では、感度 83.6%、特異度 86.8%、ROC 曲線下面積 0.93

[24] と報告されており、本研究における NT-proANP 測定は血漿 ANP 濃度と同等もしくはそれ以上の診断精度を有していると考えられた。

今回 NT-proANP 濃度を測定した心疾患犬は大部分が ISACHC クラス II に分類されたため、重症度と測定値の相関については検討することができなかった。Boswood らの報告 [11] では血漿 proANP 31-67 と心疾患の重症度には相関がみられなかった。しかし最近の報告では血漿 ANP 濃度が犬の心疾患の重症度と相関しており [24]、今回の測定系を用いた場合、血漿 NT-proANP 濃度が重症度評価に有用である可能性がある。今後、様々な重症度の心疾患犬において血漿 NT-proANP 濃度を測定する必要がある。

以上より、犬特異的 NT-proANP ELISA 測定系の測定精度は良好であった。心疾患を有する犬では高い血漿 NT-proANP 濃度がみられ、犬の心疾患のスクリーニング検査として血漿 NT-proANP 濃度測定が有用である可能性が示唆された。心疾患の重症度判定及び治療効果の評価については今後の検討が必要である。

引用文献

- [1] Hori Y, Yamano S, Kanai K, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S : Clinical implications of measurement of plasma atrial natriuretic peptide concentration in dogs with spontaneous heart disease, *J Am Vet Med Assoc*, 239, 1077-1183 (2011)
- [2] Oyama MA, Sisson DD, Solter PF : Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations, *Am J Vet Res*, 68, 42-47 (2007)
- [3] Ackerman BH, Wyeth RP, Vesely DL, Ngo WL, Bissett JK, Winters CJ, Sallman AL : Pharmacokinetic characterization of the postdistribution phase of pro-hormone atrial natriuretic peptides amino acids 1-98, 31-67, and atrial natriuretic factor during and after rapid right ventricular pacing in dogs, *J Clin Pharmacol*, 32, 415-421 (1992)
- [4] Oikawa S, Imai M, Ueno A, Tanaka S, Noguchi T, Nakazato H, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H : Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide, *Nature*, 309, 724-726 (1984)
- [5] Lerman A, Gibbons RJ, Rodeheffer RJ, Bailey KR, McKinley LJ, Heublein DM, Burnett JC : Circulating N-terminal atrial natriuretic peptide as a marker for symptomless left-ventricular dysfunction, *Lancet*, 341, 1105-1109 (1993)
- [6] Sjöstrand K, Wess G, Ljungvall I, Häggström J, Merveille AC, Wiberg M, Gouni V, Lundgren Willesen J, Hanås S, Lequarré AS, Mejer Sørensen L, Wolf J, Tiret L, Kierczak M, Forsberg S, McEntee K, Battaille G, Seppälä E, Lindblad-Toh K, Georges M, Lohi

- H, Chetboul V, Fredholm M, Höglund K : Breed differences in natriuretic peptides in healthy dogs, *J Vet Intern Med*, 28, 451-457 (2014)
- [7] Häggström J, Lord PF, Höglund K, Ljungvall I, Jöns O, Kwart C, Hansson K : Short-term hemodynamic and neuroendocrine effects of pimobendan and benazepril in dogs with myxomatous mitral valve disease and congestive heart failure, *J Vet Intern Med*, 27, 1452-1462 (2013)
- [8] Kelliham HB, Mackie BA, Stepien RL : NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension, *J Vet Cardiol*, 13, 171-182 (2011)
- [9] Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S : The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease, *J Small Anim Pract*, 49, 26-32 (2008)
- [10] Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF : Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I, *J Vet Intern Med*, 21, 238-242 (2007)
- [11] Boswood A, Attree S, Page K : Clinical validation of a proANP 31-67 fragment ELISA in the diagnosis of heart failure in the dog, *J Small Anim Pract*, 44, 104-108 (2003)
- [12] Häggström J, Hansson K, Kwart C, Pedersen HD, Vuolteenaho O, Olsson K : Relationship between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease, *J Vet Cardiol*, 2, 7-16 (2000)
- [13] Oikawa S, Imai M, Inuzuka C, Tawaragi Y, Nakazato H, Matsuo H : Structure of dog and rabbit precursors of atrial natriuretic polypeptides deduced from nucleotide sequence of cloned cDNA, *Biochem Biophys Res Commun*, 132, 892-899 (1985)
- [14] International Small Animal Cardiac Health Council: Recommendations for diagnosis of heart disease and treatment of heart failure in small animals, *Textbook of canine and feline cardiology*, Fox PR, et al eds, 2nd ed, 883-901, Saunders, Philadelphia (1999)
- [15] Youden WJ : Index for rating diagnostic tests, *Cancer*, 3, 32-35 (1950)
- [16] Kool MJ, Wijnen JA, Derkx FH, Struijker Boudier HA, Van Bortel LM : Diurnal variation in prorenin in relation to other humoral factors and hemodynamics, *Am J Hypertens*, 7, 723-730 (1994)
- [17] Chiang FT, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, Tseng YZ, Hsieh PS, Wu TL : Circadian variations of atrial natriuretic peptide in normal people and its relationship to arterial blood pressure, plasma renin activity and aldosterone level, *Int J Cardiol*, 46, 229-233 (1994)
- [18] Kokkonen UM, Riskilä P, Roihankorpi MT, Soveri T : Circadian variation of plasma atrial natriuretic peptide, cortisol and fluid balance in the goat, *Acta Physiol Scand*, 171, 1-8 (2001)
- [19] Kanervo A, Arjamaa O, Vuolteenaho O, Leppäluoto J : Daily patterns of plasma atrial natriuretic peptide, serum osmolality and haematocrit in the rat, *Acta Physiol Scand*, 141, 45-48 (1991)
- [20] Oliveira MH, Antunes-Rodrigues J, Leal AM, Elias LL, Moreira AC : Circadian variations of plasma atrial natriuretic peptide and corticosterone in rats with continuous or restricted access to food, *Life Sci*, 53, 1795-1801 (1993)
- [21] Winters CJ, Sallman AL, Vesely DL : Circadian rhythm of prohormone atrial natriuretic peptides 1-30, 31-67 and 99-126 in man, *Chronobiol Int*, 5, 403-409 (1988)
- [22] Vesely DL, Kanabrocki EL, Sothorn RB, Scheving LE, Tsai TH, Greco J, Bushell DL, Rumblyrt J, Sturtevant RP : The circadian rhythm of the N-terminus and C-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone, *Chronobiol Int*, 7, 51-57 (1990)
- [23] Sothorn RB, Vesely DL, Kanabrocki EL, Bremner FW, Third JL, McCormick JB, Dawson S, Greco J, Bean JT, Nemchausky BM, Shirazi P, Scheving LE : Circadian relationships between circulating atrial natriuretic peptides and serum sodium and chloride in healthy humans, *Am J Nephrol*, 16, 462-470 (1996)
- [24] Hori Y, Yamano S, Kanai K, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S : Clinical implications of measurement of plasma atrial natriuretic peptide concentration in dogs with spontaneous heart disease, *J Am Vet Med Assoc*, 239, 1077-1083 (2011)

ELISA Measurement of Plasma N-terminal Pro-Atrial Natriuretic Peptide
Concentrations in Dogs

Naohito NISHII¹⁾, Satoshi TAKASHIMA^{1)†}, Tatsuya MATSUBARA¹⁾, Masa-aki KOJIMA²⁾,
Megumi HOSHINO²⁾, Tatsuyuki HACHISU²⁾ and Hitoshi KITAGAWA¹⁾

1) *Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu-shi, 501-1193, Japan*

2) *Sibayagi Co., Ltd, 1062-1 Ishihara, Shibukawa, 377-0007, Japan*

SUMMARY

We have validated a sandwich ELISA for measuring canine plasma N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP). The intra-assay coefficient of variation was 2.0~2.5%, and the inter-assay coefficient of variation was 0.4~2.6%. The spike and recovery test showed recovery rates ranging between 98% and 103%. Good linearity was observed in the linearity experiment. Plasma concentrations of NT-proANP were determined in normal dogs (n=23) and dogs with mitral regurgitation (n=30) or filariasis (n=4). Plasma NT-proANP concentrations in dogs with mitral regurgitation (426.9 ± 225.7 pg/ml) and filariasis (753.3 ± 321.7 pg/ml) were significantly higher than those in normal dogs (73.9 ± 22.4 pg/ml). The present results suggest that the new ELISA for NT-proANP could be useful for diagnosing canine cardiac disease.

— Key words : cardiac disease, dogs, NT-proANP.

† *Correspondence to : Satoshi TAKASHIMA (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)*

1-1 Yanagido, Gifu-shi, 501-1193, Japan

TEL · FAX 058-293-2950 E-mail : sotakash@gmail.com

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 68~72 (2015)