

肥大型心筋症の心室筋における心房性ナトリウム利尿ポリペプチドの発現：心内膜心筋生検標本の免疫組織学的検討

Expression of atrial natriuretic polypeptide in ventricles of heart with hypertrophic cardiomyopathy: An immunohistochemical study of endomyocardial specimens

竹村 元三  
藤原 久義  
堀毛 清史  
河合 忠一  
向山 政志  
斉藤 能彦  
中尾 一和  
井村 裕夫  
藤原 兌子

Genzo TAKEMURA  
Hisayoshi FUJIWARA  
Kiyoshi HORIKE  
Chuichi KAWAI  
Masashi MUKOYAMA  
Yoshihiko SAITO  
Kazuwa NAKAO  
Hiroo IMURA  
Takako FUJIWARA

**Summary**

To investigate the ventricular expression of atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human hypertrophic heart, we conducted an immunohistochemical study using endomyocardial biopsy specimens obtained from the right side of the interventricular septum (RVB), left ventricular free wall (LVB), or both of 39 patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM), and 9 control subjects without hypertrophy. No HCM patients had apparent congestive heart failure. ANP was not present in control subjects' RVB or LVB specimens, but was found in HCM patients', showing its characteristic distribution patterns (RVB>LVB,  $p<0.05$ ); it was present in 15 of 36 RVB (42%) and 2 of 25 LVB (8%). No clinical data, including echocardiographic, hemodynamic and angiographic data, were directly related to ventricular ANP expression in HCM. According to histological data, however, ANP-present RVB specimens of HCM had larger myocytes, severer fibrosis and myofiber disarray than the specimens without ANP. This indicates that a failing state may not be a prerequisite for

京都大学医学部 第三内科  
京都市左京区聖護院川原町 54 (〒606)

The Third Division, Department of Internal Medicine, Kyoto University School of Medicine, Kawaracho 54, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606

Received for publication March 8, 1990; accepted September 8, 1990 (Ref. No. 37-12)

ANP expression in human hypertrophic ventricles, but that ventricular ANP expression may occur concomitantly with myocyte hypertrophy as an adaptive response to focal stress due to "histological overloads" such as disarray and fibrosis in HCM, which may be reflected in the characteristic distribution patterns of intraventricular ANP.

**Key words**

Atrial natriuretic factor

Hypertrophic cardiomyopathy

Ventricle

Immunohistochemistry

**目 的**

心房性ナトリウム利尿ポリペプチド (ANP) は体液・電解質・血管のホメオスターシスに与るホルモンであり, 本来, 主に心房筋にて生成・分泌されている<sup>1-3)</sup>. 近年, 心不全を有する患者において, 血中のみならず, 心室筋においても ANP が増大していることが報告され, その機序として心室筋に対する血行動態的負荷が提唱されている<sup>4-6)</sup>. また ANP の投与が心不全の改善をもたらすことから<sup>7)</sup>, 心室での ANP 増大は心臓の代償機構の一つとみなす考えがある<sup>5,6)</sup>. 一方, 心室での ANP は心筋肥大に伴って発現する肥大のマーカーという考えもあり<sup>8,9)</sup>, その発現機序・意義についてはいまだ十分解明されているとは言えない.

種々の心疾患の心室における ANP の発現を調べることは, その発現機構・病態的意義を解明する上で重要と思われる. そこで, 今回我々は原因不明の心肥大を来す肥大型心筋症 (HCM) の患者から得られた心内膜心筋生検標本にて ANP の発現を免疫組織学的に検討し, その発現と臨床ならびに組織学的パラメーターとの関連を調べた.

**対象および方法**

対象は臨床的に HCM と診断され, 心内膜心筋生検を受けた患者 39 例である. コントロールとして, 胸痛, 不整脈などのために心疾患を疑われたが, 種々の検査にて器質的心疾患を否定された正常対照 9 例を用いた. いずれの患者にも心不全の既往歴, 臨床所見はみられず, 全例 New York Heart Association の機能分類で I 度であ

った.

全患者で心内膜心筋生検に加えて, 心エコー図法による壁厚の計測, 心臓カテテル検査による血行動態の評価, 冠動脈および左室造影検査を行なった. 心内膜心筋生検は HCM では 22 例で両心, 14 例で右心のみ, 3 例で左心のみから行ない, コントロールでは各々 4 例, 4 例, 1 例であった. したがって得られた標本は HCM で右室側 36 例, 左室側 25 例であり, コントロールでは右室側 8 例, 左室側 5 例であった.

生検標本は採取後, 直ちに 10% 緩衝ホルマリンにて固定, パラフィン包埋後, 4 ないし 25  $\mu\text{m}$  切片に薄切, ヘマトキシリン・エオジン, およびマッソン・トリクロームで染色した. それらを光顕下に観察し, 各切片ごとに心筋細胞の平均横径 ( $\mu\text{m}$ ), 線維化の程度 (0~3), 錯綜配列の程度 (0~3) をすでに報告した方法<sup>6,10,11)</sup> で決定した.

4  $\mu\text{m}$  薄切切片上で, ヒト  $\alpha\text{ANP}$  に対する単クローン抗体<sup>11)</sup> を一次抗体として酵素抗体法 (間接法) を前述の方法<sup>6)</sup> を用いて行なった. 光顕観察にて ANP の免疫反応が陽性のものを ANP 陽性切片とした. 同抗体は  $\alpha\text{ANP}$  のみならず,  $\beta\text{ANP}$  と 80%,  $\gamma\text{ANP}$  と 100% の交差性を有する<sup>12)</sup>.

統計処理には  $\chi^2$  検定, t 検定を用い, 5% 未満を有意とした.

**成 績**

**Table 1** に両心生検を受けた HCM 患者 (22 例), コントロール (4 例) 各群の心エコー図, 血行動態, 造影所見に基づく臨床データを示す. HCM では心室中隔壁厚および左室拡張終期圧がコントロールに比し有意に大であったが, その他のパラ

**Table 1. Clinical data of the controls and patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM) who underwent the endomyocardial biopsy procedures**

	Controls (n=4)	HCM (n=22)
Age (yrs)	53±9	47±11
Sex (M/F)	2/2	16/6
LVEDVI (ml/m <sup>2</sup> )	65±12	64±19
LVESVI (ml/m <sup>2</sup> )	22±8	19±7
VST (mm)	9±0	17±3*
LVT (mm)	10±1	10±2
LVSP (mmHg)	112±24	121±20
LVEDP (mmHg)	7±2	14±7*
RVSP (mmHg)	24±6	24±4
RVEDP (mmHg)	4±3	5±2
CI (l/min/m <sup>2</sup> )	3.2±0.6	3.0±0.4
EF (%)	68±6	70±7

Abbreviations: LVEDVI and LVESVI=left ventricular end-diastolic and end-systolic volume index; VST and LVT=ventricular septal and left ventricular posterior wall thickness; LVSP and LVEDP=left ventricular peak systolic and end-diastolic pressure; RVSP and RVEDP=right ventricular peak systolic and end-diastolic pressure; EF=ejection fraction; CI=cardiac index.

\*: significant difference compared to the controls with  $p<0.05$  (t-test).

メーターには差がなかった。

**Table 2** に各群の左右の心内膜心筋生検標本の病理組織データを示す。HCM では、コントロールに比し、左右とも、細胞径、線維化、錯綜配列のすべてのパラメーターが有意に高値を示した。HCM では錯綜配列の程度が左心標本に比し右心に大であった。またコントロールで細胞径が右心に比し左心で大であったが、HCM ではその差はみられなかった。

HCM 例の ANP は、心筋細胞の細胞質に、細かい茶褐色の免疫反応陽性物質として観察された (**Fig. 1**)。ANP 顆粒は核周囲に集まってみられる傾向があったが、細胞質の末梢にも広く分布していた。一次抗体を省略した標本には免疫反応が全くみられなかった。ANP の陽性コントロールとして用いた右心耳の切片では、ANP が強陽性であった (**Fig. 1**)。

コントロールでは全例、左右とも ANP はみられなかったが、HCM では右室側 36 例中 15 例 (42%)、左室側 25 例中 2 例 (8%) が ANP 陽性であった。

両心生検を受けた HCM 患者 22 例で、左右いずれか、または両心の標本が ANP 陽性であった 11 例と、左右いずれも陰性であった 11 例の間で、臨床データを比べたところ、いずれのパラメーターにも有意差は認められなかった (**Table 3**)。一

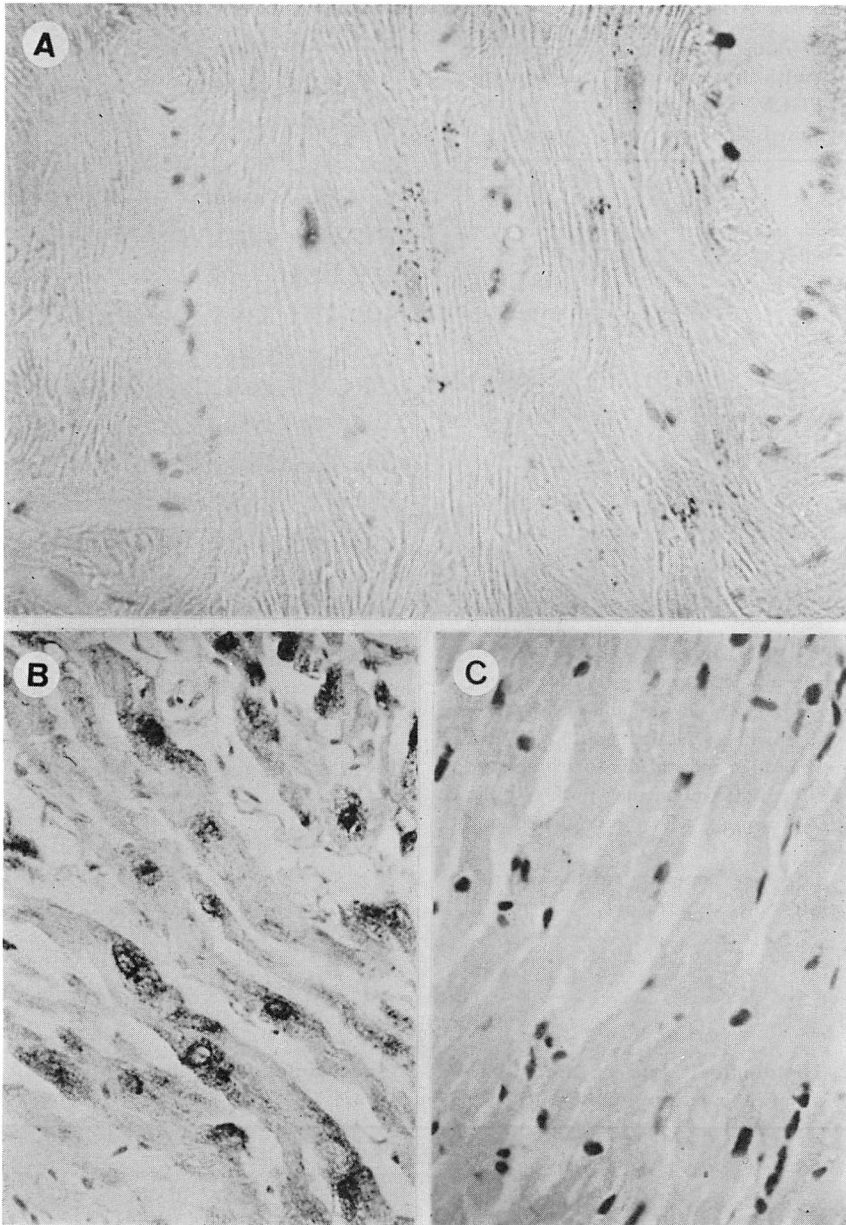
**Table 2. Histological data of the right and left ventricles from the control and hypertrophic cardiomyopathy (HCM) groups**

	Controls		HCM	
	RVB (n=8)	LVB (n=5)	RVB (n=36)	LVB (n=25)
Size of myocytes ( $\mu\text{m}$ )	13±2	16±1	20±4*	21±3*
Degree of fibrosis	0.4±0.5	0.3±0.5	1.5±0.8*	1.4±0.6
Degree of myofiber disarray	0.4±0.8	0.0±0.0	1.7±0.8*	0.8±0.7*

RVB=right ventricular biopsies; LVB=left ventricular biopsies.

\*: significant difference from the ipsilateral side of the control group with  $p<0.05$  (t-test).

\*\* : significant difference between RVB and LVB with  $p<0.05$  (t-test).



**Fig. 1. Microphotographs of immunohistochemical tissue preparation obtained during ventricular endomyocardial biopsy or surgery.**

(A) A section of the right ventricle from a case of HCM. Dark brown, fine granules are observed in the cytoplasm of some of the hypertrophic myocytes. A representative ANP-present myocyte appears in the center of the panel. The ANP granules can be seen in both the perinuclear region and periphery of the cytoplasm (original magnification of  $\times 400$ ).

(B) A section of the right atrial appendage obtained during cardiac surgery. The ANP granules are abundant in atrial myocytes ( $\times 400$ ).

(C) A section of the right ventricle from the control group. No immunoreactive substance can be seen ( $\times 400$ ).

ANP=atrial natriuretic polypeptide. Other abbreviations : see Table 1.

**Table 3. Comparison of clinical values between patients with HCM and without ventricular ANP expression#**

Ventricular ANP expression	HCM (n=22)	
	+(n=11)	-(n=11)
LVEDVI (ml/m <sup>2</sup> )	58±15	70±22
LVESVI (ml/m <sup>2</sup> )	16±6	22±7
VST (mm)	16±2	18±3
LVT (mm)	10±1	11±2
LVSP (mmHg)	119±20	123±21
LVEDP (mmHg)	13±6	15±8
RVSP (mmHg)	23±5	24±4
RVEDP (mmHg)	4±2	6±2
CI (l/min/m <sup>2</sup> )	70±7	69±6
EF (%)	2.9±0.4	3.1±0.5

#: The analysis was performed in 22 HCM patients who underwent biventricular endomyocardial biopsy procedures. The patients with ventricular ANP expression were defined as those who showed the ANP-present specimen in RVB, LVB, or both.

+ = present; - = absent. Other abbreviations: see Table 1 and Fig. 1.

方, 病理組織データでは, ANP 陽性右室側標本 (15例) は, 陰性標本 (21例) に比し, 細胞径, 線維化の程度, 錯綜配列の程度がともに有意に大であった (Table 4).

**Table 4. Comparison of histological parameters between the HCM specimens with and without ANP expression**

Ventricular ANP expression	RVB (n=36)		LVB (n=25)	
	+(n=15)	-(n=21)	+(n=2)	-(n=23)
Size of myocytes (μm)	24±3	18±3	25±9	20±3
Degree of fibrosis	1.9±0.8	1.1±0.6	2.0±0.0	1.2±0.5
Degree of myofiber disarray	2.0±0.8	1.4±0.8	1.0±1.4	0.7±0.6

\*: significant difference with  $p < 0.005$  (t-test).

Abbreviations: see Table 2 and Fig. 1.

## 考 察

心筋細胞肥大は, 動物モデルおよびヒトにおいても, 心室での ANP 発現に密接に関連していると思われる<sup>6,9)</sup>. 心筋細胞肥大はスターリングの法則あるいはカテコールアミンの増加と同様, 心収縮力の低下ないし血行動態的負荷の増大に対する心臓の自己代償機構の一つとみなされている<sup>13)</sup>. 一方, ANP は心不全患者に投与された場合, 心不全状態を改善することが報告されており<sup>7)</sup>, これらのことより, ANP 発現と心筋細胞肥大は, ともに負荷状態下における心臓の適応現象 (代償) であることが示唆されている<sup>4-6)</sup>. 近年, 拡張型心筋症, 弁膜症, 心筋梗塞等, 心不全を伴う種々の心疾患患者の心室筋において, ANP の発現が報告されている<sup>4-6)</sup>. ところが, 一方では心室での ANP 発現は代償機構というよりは, むしろ心筋肥大に随伴して生じるマーカーの一つであるという可能性が, 動物モデルを用いた研究で提唱されている<sup>8,9)</sup>. 本研究にて, 我々は HCM の心室中隔に ANP 発現の増大を示したが, HCM では明らかな血行動態的負荷を伴わない心筋細胞肥大がみられる. 今回の HCM の例は, ヒトの心室における ANP 発現にとって, 心不全状態は必ずしも不可欠ではないことを示している.

以前, 我々は拡張型心筋症, 大動脈弁閉鎖不全症等の拡張性心肥大において ANP が増大し, そ

の程度は心室中隔右室側に比し, 血行動態的負荷のより強い左室自由壁で著しいことを示した<sup>6)</sup>. 今回, HCM の心室筋での ANP 増大を示したが, その心室内分布は, 上記疾患と対照的に, 右室側に有意に高頻度であった. HCM の右心系では圧負荷も容量負荷もともにみられないのが一般的である. また HCM の左心室壁張力は, 収縮期, 拡張期とも正常に比しむしろ低いという報告がある<sup>14)</sup>. 今回の対象の HCM 例では左室拡張終期圧の上昇は認められたが, これと ANP 発現との関連はみられなかった. 一方, HCM で ANP 陽性の右室側標本には, ANP 陰性標本に比してより強度な組織学的変化, すなわち, より強い心筋細胞肥大, より高度の線維化および錯綜配列がみられた.

我々は以前, HCM にみられる錯綜配列において, 心室腔に対して垂直方向に走る線維成分が多く含まれていることを報告した<sup>11)</sup>. この場合, 通常とは逆に, 収縮期には垂直走行の心筋線維が心室壁を薄く, 心室腔を大きくする方向に収縮し, 拡張期には心室壁を厚く, 心室腔を小さくする方向に弛緩すると考えられる. したがって, このような線維成分が多量に存在する場合は, 血行動態的負荷がないにもかかわらず, その心室壁の運動は低下するであろう. 事実, HCM の心室中隔では収縮期壁肥厚が軽度であり, 上記のような状態が関与している可能性がある. さらに, 錯綜配列を呈する線維の走行異常は組織内部に, 局所的かつ不均一なストレスの分布を生じることが推測される. また, 心筋線維相互の協同運動を中断する線維化も, 同様の結果を組織内部にもたらすと考えられる.

以上より, HCM の心室での ANP は, 錯綜配列, 線維化等によって生じる組織内部での微少なストレス(「組織学的負荷」と仮称する)に対する適応反応として発現すると推測される. よって, 他の心疾患同様, HCM の心室における ANP 発現は広義での適応現象, すなわち, 「組織学的負荷」により運動低下を来した局所心筋の潜在的な

全状態に対する代償ないし予防反応であり, 心筋細胞肥大に伴い, 肥大と同様の意義をもつ現象と考えられる.

## 結 論

1. HCM では心室中隔右室側の心室筋で ANP の増大がみられ, 他の心疾患同様, ANP の発現と心筋細胞肥大との関連が示唆された.
2. その発現は従来から言われている血行動態的負荷では説明できず, 線維化, 錯綜配列などの組織構築の異常に伴う局所的なストレス(「組織学的負荷」)が関連することが示唆された.
3. HCM の心室筋での ANP 増大は広義の代償反応と推測されたが, 今後さらに検討を要する課題である.

## 要 約

ヒト肥大心の心室筋における心房性ナトリウム利尿ポリペプチド (ANP) の発現について知るため, 原因不明の心肥大を来す肥大型心筋症 (HCM) 患者 39 例から得られた心内膜心筋生検標本 (中隔右室側, 左室自由壁側, または両側) を用いて, ANP を免疫組織学的に検討した. 心肥大のない患者 9 例を対照とした. いずれの患者も心不全は有していなかった.

ANP は対照例では全例 (右室 8 例, 左室 5 例) に認められなかったが, HCM では右室 36 例中 15 例 (42%), 左室 25 例中 2 例 (8%) に認められ, 特徴的な分布を示した (右室 > 左室). ANP 陽性群と陰性群の比較では, 心エコー図, 血行動態, 左室造影等の臨床データでは差がみられなかったが, 心筋細胞径, 線維化・錯綜配列の程度などの組織学的データは, ANP 陽性群で有意に大であった.

以上より, HCM の心室筋で ANP が増大し, それは左室自由壁に比し中隔右室側で高頻度であり, さらに, その発現は血行動態的ストレスだけでは説明されず, 線維化・錯綜配列などの組織構築の異常による, 心室筋に対する局所的な

ストレス (組織学的負荷) の関連が示唆された。

文 献

- 1) De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* **28**: 89-94, 1981
- 2) Needleman P, Adams SP, Cole BR, Currie MG, Geller DM, Michener ML, Saper CB, Schwarz D, Standaert DG: Atriopeptins as cardiac hormones. *Hypertension* **7**: 469-482, 1985
- 3) Cantin M, Genest J: The heart and the atrial natriuretic factor. *Endocrine Rev* **6**: 107-127, 1985
- 4) Tsuchimochi H, Kurimoto F, Ieki K, Koyama H, Takaku F, Kawana M, Kimata S, Yazaki Y: Atrial natriuretic peptide distribution in fetal and failed adult human hearts. *Circulation* **78**: 920-927, 1988
- 5) Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Mukoyama M, Hosoda K, Kawai C, Ban T, Yasue H, Imura H: Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest* **83**: 298-305, 1989
- 6) Takemura G, Fujiwara H, Horike K, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Matsuda M, Kawamura A, Ishida M, Kida M, Uegaito T, Tanaka M, Matsumori A, Fujiwara Y, Fujiwara T, Imura H, Kawai C: Ventricular expression of atrial natriuretic polypeptide and its relations with hemodynamics and histology in dilated human hearts: Immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* **80**: 1137-1147, 1989
- 7) Saito Y, Nakao K, Nishimura K, Sugawara A, Okumura K, Obata K, Sonoda R, Ban T, Yasue H, Imura H: Clinical application of atrial natriuretic polypeptide in patients with congestive heart failure: Beneficial effects on left ventricular function. *Circulation* **76**: 115-124, 1987
- 8) Lee RT, Bloch KD, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Neer EJ, Seidman CE: Atrial natriuretic factor gene expression in ventricles of rats with spontaneous biventricular hypertrophy. *J Clin Invest* **81**: 431-434, 1988
- 9) Nemer M, Lavigne JP, Drouin J: Ventricular atrial natriuretic factor gene expression: A marker for cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem* **12A** (Suppl): 17, 1988 (abstr)
- 10) Fujiwara H, Kawai C, Hamashima Y: Myocardial fascicle and fiber disarray in 25-micron-thick sections. *Circulation* **59**: 1293-1298, 1979
- 11) Fujiwara H, Hoshino T, Fujiwara T, Kawai C, Hamashima Y: Classification and distribution of myocardial fascicle and fiber disarray in 14 hearts with hypertrophic cardiomyopathy in 25  $\mu$  thick sections. *Jpn Circ J* **46**: 225-234, 1982
- 12) Mukoyama M, Nakao K, Sugawara H, Morii N, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Saito Y, Arai H, Mori T, Yamada H, Sano Y, Imura H: A monoclonal antibody to  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide. *Hypertension* **12**: 117-121, 1988
- 13) Braunwald E: Pathophysiology of heart failure. *in* Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. (ed by Braunwald E). WB Saunders, Philadelphia, 1988, pp 426-448
- 14) Grossman W, Jones D, McLaurin LP: Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* **56**: 56-64, 1975