HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	羊水中BNP濃度に影響する周産期因子についての検討
Author(s)	卯月, ゆたか
Description	配架番号：2362
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12983号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12983
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88959
Type	doctoral thesis
File Information	Yutaka_Uzuki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

羊水中BNP濃度に影響する周産期因子についての検討

(Study on perinatal factors influencing BNP levels in amniotic fluid)

2018 年 3 月

北海道大学

卯月ゆたか

学位論文

羊水中BNP濃度に影響する周産期因子についての検討

(Study on perinatal factors influencing BNP levels in amniotic fluid)

2018 年 3 月

北海道大学

卯月ゆたか

目次

発表論文及び学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8 頁
研究方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
研究の結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19 頁
総括及び結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Yutaka Uzuki, Kazutoshi Cho, Tetsuo Onda, Masahiko Ikeda, Yuta Furuse, Mamoru Morikawa, Tadashi Ariga: Perinatal factors influencing BNP levels in amniotic fluid. Pediatric Research (2017)(投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 卯月ゆたか、長　和俊、古瀬優太、池田雅彦、恩田哲雄
   羊水 BNP 濃度に影響を与える周産期因子の解析
   北海道新生児談話会(第 30 回北海道新生児談話会)
   2017 年 11 月 12 日・札幌
2. Yutaka Uzuki, Kazutoshi Cho, Tetsuo Onda, Masahiko Ikeda, Yuta Furuse, Mamoru Morikawa, Tadashi Ariga
   Factors Influencing BNP Levels in Amniotic Fluid
   Hot Topics in Neonatology 2017
   2017 年 12 月 10-13 日・ワシントン D.C

緒言

1. ナトリウム利尿ペプチドの種類

心房の心筋細胞に分泌顆粒が存在することから、心臓が血液を送り出すポンプであるだけでなく、分泌器官でもあることは古くから推察されていた。しかし，その分泌顆粒の機能は不明であった。その後、心房の抽出液に利尿作用と血管拡張作用があることが報告され、寒川らが心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide, ANP)を 1984 年に世界に先駆けて発見した[1]。その後、脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide, BNP)、C 型ナトリウム利尿ペプチド(C-type natriuretic peptide, CNP)が発見され、循環器疾患の診断、治療などに利用されている。ANP と BNP は、それぞれ A 型ナトリウム利尿ペプチド(A-type natriuretic peptide)、B 型ナトリウム利尿ペプチド(B-type natriuretic peptide)とも称される[2]。

2. ナトリウム利尿ペプチドの分子構造

ANP、BNP および CNP は、分子内に 17 アミノ酸からなる共通の環状構造を有するペプチドホルモンである(図 1)[3,4,5]。

ANP は前駆体である pre-proANP(151 アミノ酸)から proANP(γ-ANP)(126 アミノ酸)を経て分泌過程で活性型の ANP(α-ANP)(28 アミノ酸)に変換される。

心筋細胞において合成された pre-proBNP(134 アミノ酸)は N 末端側の 26 アミノ酸が切断されて proBNP(108 アミノ酸)となる。proBNP はさらに N 末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド(N-terminal proBNP, NT-proBNP)(76 アミノ酸)と BNP(32 アミノ酸)に分解される[6,7]。proBNP の N 末端側が NT-proBNP、C 末端側が BNP として分泌されるため、BNP と NT-proBNP のモル比は 1 である[4]。

CNP は前駆体の pre-proCNP(126 アミノ酸)として合成された後、proCNP(103 アミノ酸)に変換される。proCNP は分解されて CNP-53 となり、さらにプロセシングを受けて CNP-22 となる[8,9]。CNP-53 は主に中枢神経系に存在し、神経ペプチドであると考えられている。一方、血中の CNP は主に CNP-22 である。CNP は ANP、BNP とは異なり心筋にはわずかしか発現しておらず、血中の CNP はそのほとんどが血管内皮由来と考えられている[8]。

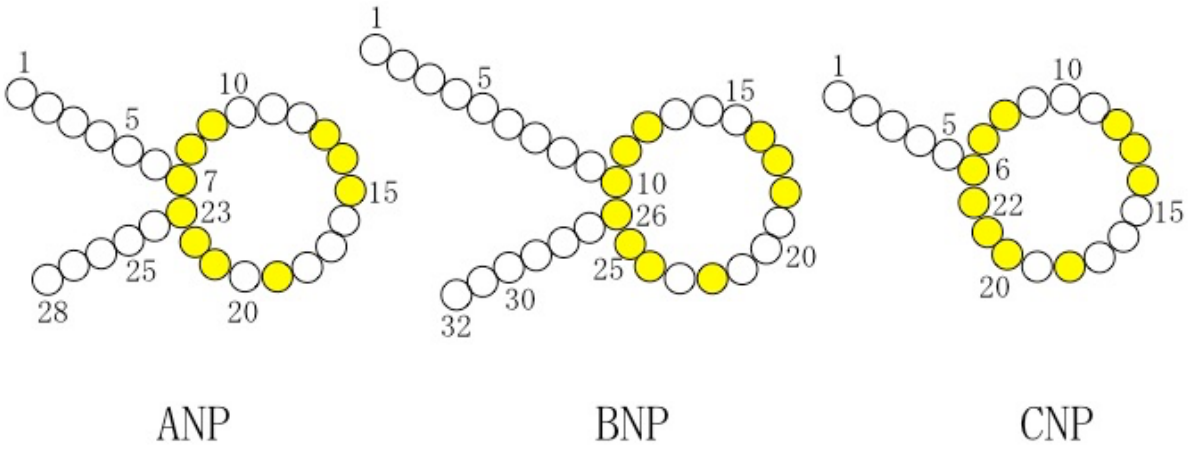


図 1. ナトリウム利尿ペプチドの一次構造

文献 5,6 より引用一部改変

ANP、BNP、CNP は 17 アミノ酸からなる共通の環状構造を有する。黄丸は NP、BNP、CNP の間で共通のアミノ酸を示す。

３．ナトリウム利尿ペプチドの代謝

ANP は生理的な状態では主に心房から分泌されるが、心臓に容量負荷が加わると心室からの分泌が増加する。BNP は正常心臓でも主に心室から分泌されており、心室に容量負荷が加わると ANP の分泌を凌駕する。CNP は前述のように主に血管内皮細胞から分泌される。ANP、BNP、CNP はいずれも過剰な容量負荷から心血管系を保護していると考えられている[10]。

ANP、BNP、CNP はそれぞれ特異的な受容体に結合する。ANP と BNP は A 型ナトリウム利尿ペプチド受容体(natriuretic peptide receptor-A, NPR-A)に、CNP は B 型ナトリウム利尿ペプチド受容体(natriuretic peptide receptor-B, NPR-B)に優先的に結合する(図 2)[11]。ナトリウム利尿ペプチドは、標的細胞表面の NPR-A、NPR-B への結合によって細胞内の環状グアノシン一リン酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)の増加を介して、ナトリウム利尿作用などの生物学的活性を発揮する。C 型ナトリウム利尿ペプチド受容体(natriuretic peptide receptor-C, NPR-C)は生物活性を有さず、ナトリウム利尿ペプチドの血中からのクリアランスに関与すると考えられている[10,12]。

ナトリウム利尿ペプチドの代謝にはこの NPR-C を介する機序の他に、腎尿細管や血管内皮細胞に多く発現する中性エンドペプチダーゼ(neutral endopeptidase, NEP)による分解が関与しており、腎臓からの排泄も血中からのクリアランスに関与すると考えられている[10]。

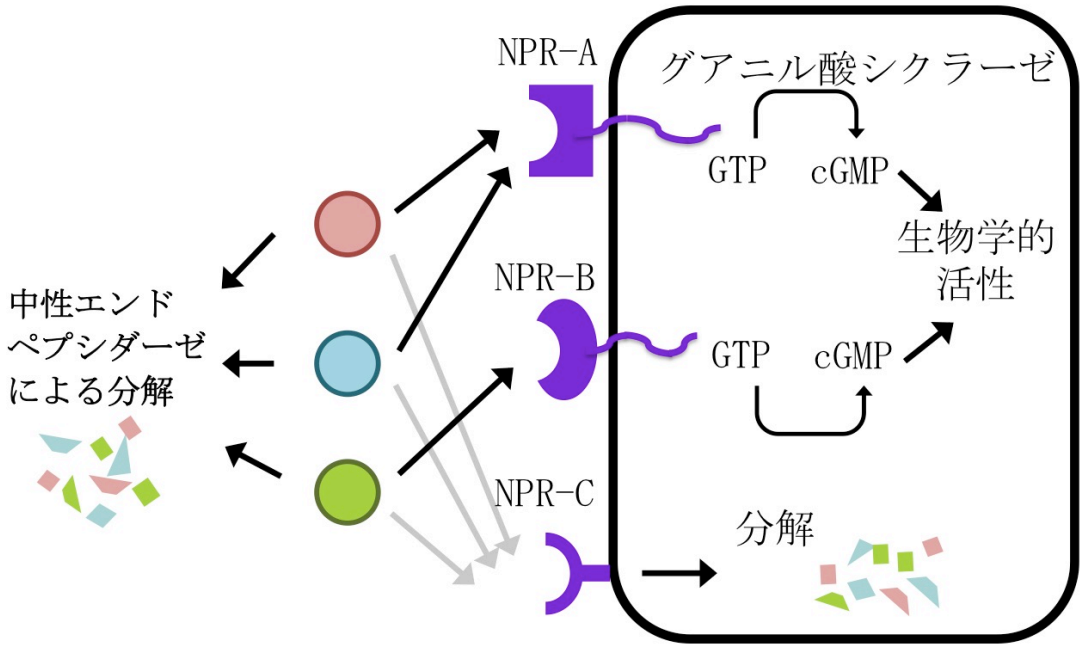


図 2　ナトリウム利尿ペプチド受容体

文献 11 より引用一部改変

ANP と BNP は NPR-A に、CNP は NRP-B に優先的に結合し、グアニル酸シクラーゼの活性化を介して生物学的活性を発揮する。NPR-C は生物学的活性を有さず、ANP、BNP および CNP の分解に寄与する。赤丸；ANP、青丸； BNP、緑丸； CNP、NPR-A；natriuretic peptide receptor-A、NPR-B；natriuretic peptide receptor-B、NPR-C；natriuretic peptide receptor-C、GTP；guanosine triphosphate、cGMP；cyclic guanosine monophosphate

4. BNP と NT-proBNP

BNP は分子量 3.5kDa の環状ペプチドで、ナトリウム利尿作用、血管拡張作用、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系阻害作用などの生物学的活性を有している。心筋に容量負荷や圧負荷が加わると、心筋細胞内で pre-proBNP が合成される。pre-proBNP は切断されて proBNP となり、心筋細胞から血中に分泌される時点で BNP と NT-proBNP に分裂する(図 3)[12,13]。BNP は前述の特異的受容体で代謝される他、未変化体として腎臓から排泄される。血中の半減期は約 20 分である。

NT-proBNP は分子量 8.5kDa で生物学的活性を持たない。血中半減期は約 60～120 分と BNP よりも長く、血中濃度は BNP よりも高い。NT-proBNP は代謝を受けることなく腎臓から排泄されるため、BNP よりも測定値が腎機能障害の影響を強く受ける(表 1)[12]。

BNP と NT-proBNP の分泌は心筋細胞の壁応力の増加とともに亢進し、両者の血中濃度は血行動態の異常、特に左室拡張末期圧の上昇や心拍出量の低下に比例して上昇する。

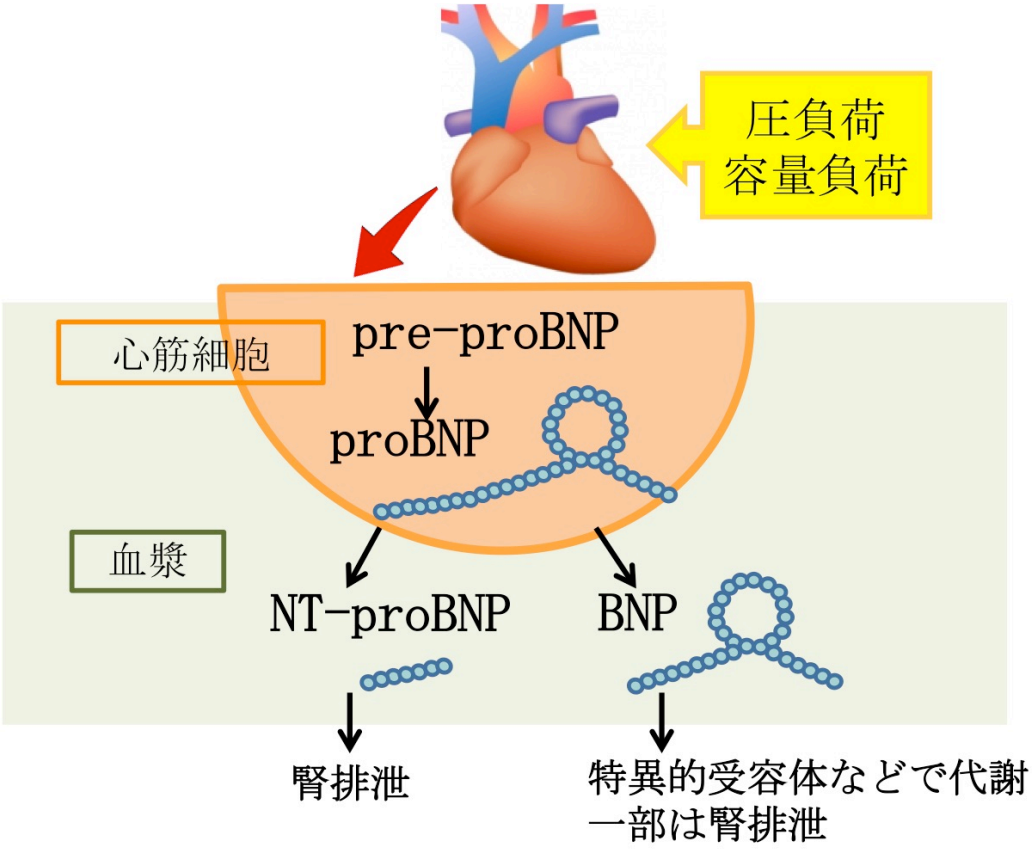


図 3. BNP と NT-proBNP の代謝

文献 12 および 13 より引用一部改変

BNP は特異的受容体および中性エンドペプチダーゼにより分解され、一部が未変化体の状態で尿中に排泄される。NT-proBNP は全てが未変化体のまま尿中に排泄される。

表 1. BNP と NT-proBNP の比較

	BNP	NT-proBNP
分子量	3.5kDa	8.5kDa
ホルモン活性	あり	なし
血清での測定	不可	可
半減期	22 分	60～120 分
排泄機序	NPR-C などで分解 腎排泄	腎排泄
腎機能の影響	＋	＋＋
安定性	やや低い	高い
血中濃度	低い	高い

文献 12 より引用一部改変

NPR-C；natriuretic peptide receptor-C

5. 本研究における羊水 BNP 測定の意義

近年、小児・新生児領域でも BNP や NT-proBNP の血中濃度が心不全の指標として利用されるようになっている。BNP の血中濃度が先天性心疾患における心不全の診断と外科介入の指標として有用であるという報告や[14]、NT-proBNP の血中濃度が早産児動脈管開存症に対するインドメタシン治療開始の指標やその効果判定に有用であるという報告がある[15]。

さらに、BNPやNT-proBNPを指標として胎児の心機能を評価する方法も模索されている。先天性心疾患、胎児不整脈、血管腫や奇形腫などの血流豊富な腫瘍、動静脈瘻、双胎間輸血症候群などの胎児期に心不全をきたしうる疾患がある。これらの疾患の胎児管理では、胎外治療へ切り替える時期を決定するために、児の未熟性と胎児の心負荷を秤にかけて判断する必要がある。現在、胎児期に心負荷を評価する方法としては、超音波検査による胎児の血流パターンや胎児水腫の評価、羊水量、胎児心拍数図などが利用されているが、胎児治療の適応や適切な娩出時期を決定するためのパラメータが不足している。出生時に採取した臍帯血のBNP濃度(以下、臍帯血BNP)が胎児心不全のマーカーとなることが報告されているが[16]、胎児期に臍帯血を採取することは侵襲が大きく困難である。一方で、妊娠14週以降の羊水の大部分は胎児尿であり、尿中BNPおよびNT-proBNP濃度は血中BNPおよびNT-proBNP濃度を反映することが知られている[17]。先行研究では、臍帯血BNPと羊水BNPが相関すること、臍帯血BNPと羊水BNPが妊娠週数と逆相関すること、生後にカテコラミン投与を必要とする例や体重差のある一絨毛膜二羊膜双胎において臍帯血BNPおよび羊水BNPが高いことが報告されている[18]。そこで我々は、羊水中BNP濃度(以下、羊水BNP)を指標として利用することを考えた。

羊水BNPあるいはNT-proBNPに関する先行研究は少ない。Hablіらは、超音波で観察した胎児の房室弁逆流、心室壁肥厚、心室機能から双胎間輸血症候群受血児の心筋障害の程度を評価し、双胎間輸血症候群が重症化するにつれ、受血児の心筋障害が進行し、羊水NT-proBNP濃度が上昇すると報告している[19]。Garofoliらは、胎児発育制限と母体・胎児・新生児のBNP濃度の関連について検討し、妊娠週数に比して適正な体重(appropriate for gestational age, AGA)児よりも胎児発育制限のある児のほうが臍帯血BNPが高値であったと報告している[20]。彼らは、母体血中BNP濃度と臍帯血中および新生児血中のBNP濃度は相関しなかったと報告している。Blohmらは、妊娠33週から41週における、母体血および臍帯血中のBNP、NT-proBNP、トロポニンなどの心血管バイオマーカーを同時に測定した。母体血と臍帯血の間にBNPおよびNT-proBNPの濃度の相関関係はなく、臍帯血のバイオマーカーは母体血よりも高値であったと報告している。また、彼らは臍帯血のバイオマーカー値は妊娠週数や分娩様式により影響を受けると報告している[21]。

臍帯血BNPおよび羊水BNPには妊娠週数、出生体重、妊娠週数に比して小さい体重(small for gestational age, SGA)、双胎妊娠、双胎間輸血症候群などの周産期因子が影響することが予想されるが、これらの因子は相互に関連している。図4に周産期因子と羊水BNPの想定される関係を示す。双胎間輸血症候群においては、双胎間の血液量不均衡のため受血児は心不全

となり、供血児は胎児発育不全の結果、妊娠週数に比して体重が小さくなる。胎児心不全によって臍帯血BNPが上昇し、羊水BNPに反映する。早産期に胎児心不全と判断されれば、胎外治療に切り替えるため帝王切開分娩で出生となる。胎児心不全のあった児は出生後に低血圧に陥りやすくなり、また、早産で出生した児は出生体重が小さく、新生児仮死や低血圧をきたすなどの機序が想定される。このように、複数の因子が相互に関連しつつ臍帯血BNPおよび羊水BNPに影響していると考えられる。しかし、これまでの羊水BNPに関する報告では、これらの多くの周産期因子の影響については十分検討されていない。

そこで、羊水BNPに影響を与える真の周産期因子を抽出することを目的にこの研究を行った。

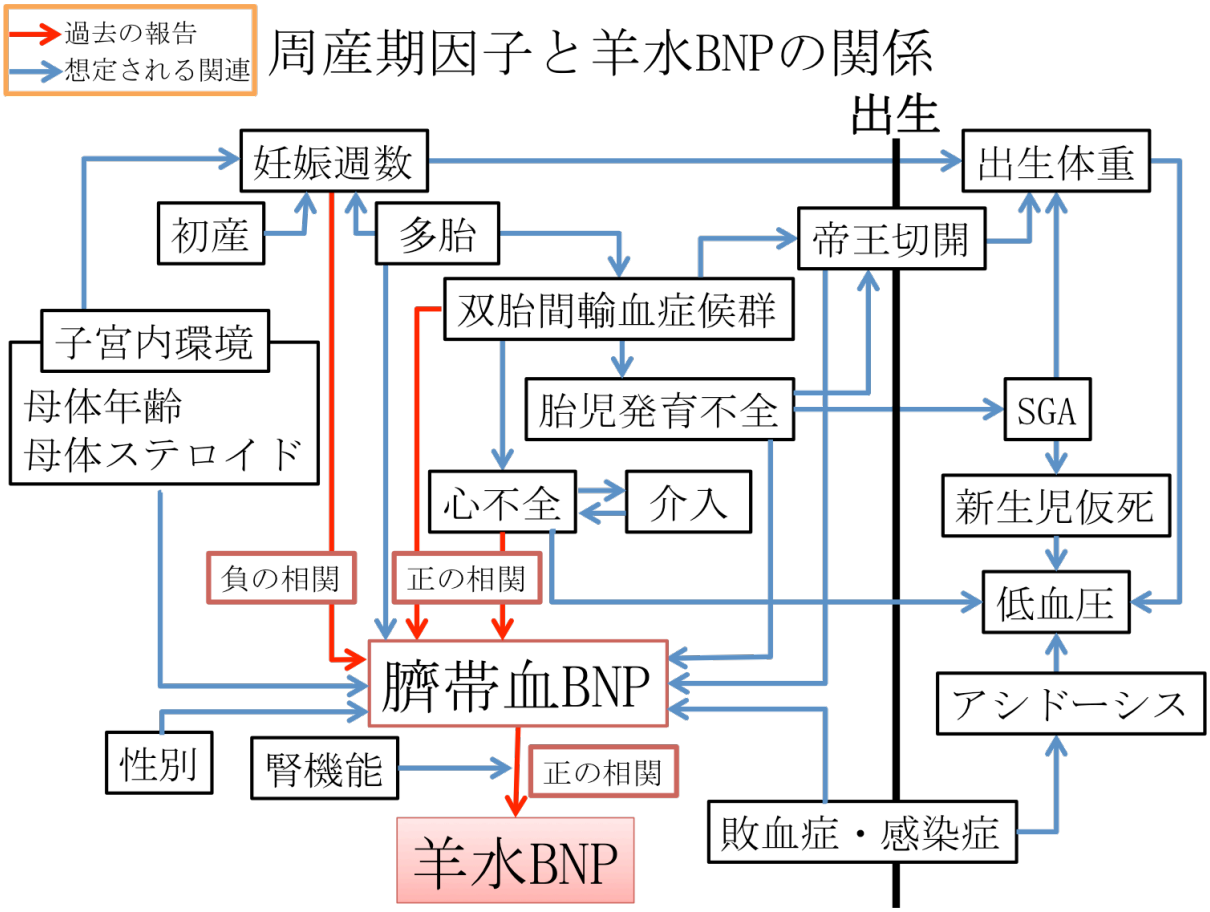


図 4. 周産期因子と羊水 BNP

赤い線はこれまでに報告されている関係、青い実線は臨床で想定される関係を示す。

略語表

本文中および図表中で使用した略語は以下のとおりである。

羊水BNP	羊水中BNP濃度
臍帯血BNP	臍帯血中BNP濃度
母体ステロイド	分娩前母体ステロイド投与
AGA	妊娠週数に比して適正な体重(appropriate for gestational age)
ANP	心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide)、A型ナトリウム利尿ペプチド(A-type natriuretic peptide)
BNP	脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide) 、B型ナトリウム利尿ペプチド(B-type natriuretic peptide)
CLIA	化学発光免疫測定法(chemiluminescent enzyme immunoassay)
cGMP	環状グアノシン一リン酸(cyclic guanosine monophosphate)
CNP	C型ナトリウム利尿ペプチド(C-type natriuretic peptide)
EIA	酵素免疫測定法(enzyme immunoassay)
FLP	胎児鏡下レーザ凝固術(fetoscopic laser photocoagulation)
GTP	グアノシン三リン酸(guanosine triphosphate)
NPR-A	A型ナトリウム利尿ペプチド受容体(natriuretic peptide receptor-A)
NPR-B	B型ナトリウム利尿ペプチド受容体(natriuretic peptide receptor-B)
NPR-C	C型ナトリウム利尿ペプチド受容体(natriuretic peptide receptor-C)
NT-proBNP	N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド (N-terminal proBNP)
RIA	ラジオイムノアッセイ(radio immunoassay)
SGA	妊娠週数に比して小さい体重(small for gestational age)

研究方法

1. 研究の種類

本研究は分娩台帳、新生児台帳および病院情報システム上の診療録を用いて行なった後方視的観察研究である。

2. 対象

2007年12月から2017年4月の間に北海道大学病院周産母子センターで出生し,羊水BNPの測定が可能であった532例のうち、染色体異常あるいは重大な形態異常のある症例を除外した484例を解析対象とした。

3. 羊水BNPおよび臍帯血BNPの測定

羊水および臍帯血を出生時に採取した。帝王切開分娩の際には子宮筋層を切開した後に胎胞を形成させ、18G注射針で胎胞を穿刺して羊水を注射器に吸引した。経腟分娩時には経腟的に胎胞を穿刺して羊水を採取した。臍帯血は娩出された胎盤に付着している臍帯から注射器で採取した。得られた羊水および臍帯血をそれぞれEDTA-2Na試験管に注入し直ちに氷冷した。検体は保存せずに病院の検査部で測定を行った。

BNP濃度測定には、2007年12月から2014年4月14日までは、酵素免疫測定法(enzyme immunoassay, EIA)(Eテスト『TOSOH』Ⅱ(BNP、東ソー株式会社、日本、測定範囲4.0〜2000 pg/mL)、2014年4月15日以降は化学発光免疫測定法(chemiluminescent enzyme immunoassay, CLIA)(アーキテクト・BNP-JP、アボットジャパン株式会社、日本、測定範囲5.8〜無希釈の場合2902 pg/mL、自動希釈の場合14510 pg/mL)を使用した。両測定法の互換性が確認されており、CLIA=1.03×EIA-4.8で換算される。全ての測定結果は、ラジオイムノアッセイ(radio immunoassay, RIA)による測定結果に換算して記載した(RIA=1.26×CLIA)。

4. 解析因子

母体因子および新生児因子からなる以下の周産期因子について、羊水 BNP との関係を解析した。母体因子としては、初産、母体年齢 35 歳未満、分娩前母体ステロイド投与(以下、母体ステロイド)、帝王切開分娩、多胎、一絨毛膜二羊膜双胎、双胎間輸血症候群、胎児鏡下レーザ凝固術(fetoscopic laser photocoagulation, FLP)の有無を用いた。分娩前母体ステロイド投与は、妊娠 34 週未満の早産が予想される場合に、児の肺成熟を促進するために行う。新生児因子としては、男児、妊娠週数に比して小さい出生体重(small for gestational age, SGA)、新生児仮死、臍帯動脈血 pH 7.2 未満、低血圧、カテコラミン投与、敗血症、新生児感染症の有無および妊娠週数、出生体重を用いた。母体年齢、SGA、低血圧、カテコラミン投与はそれぞれ以下のように定義した。分娩時の年齢を母体年齢とした。本邦の出生体重報告に

おける 10 パーセンタイル未満の出生体重を SGA とした。生後 12 時間以内に平均血圧が出生時の週数を下回る血圧低下があった場合を低血圧とした。生後 12 時間以内に低血圧に対してカテコラミンを使用した場合をカテコラミン投与ありとした。生後 1 分の Apgar score が 7 点未満を新生児仮死とした。

5. 統計学的方法

羊水BNPの対数が正規分布するため，羊水BNPの常用対数を用いて解析を行い，結果はBNPに換算して示した。統計学的方法として，各周産期因子の有無で分けた2群間の羊水BNPの比較にはStudentのt検定を用いた。変数間の相関についてはPearsonの相関係数を用いた。比率の比較にはχ^2検定を用いた。単変量解析で有意差あるいは有意な相関が認められた因子を独立変数、羊水BNPの対数を従属変数としてステップワイズ回帰解析を行い、羊水BNPに影響する独立変数を抽出した。羊水BNP濃度に影響すると考えられる因子を調整した後に、95%信頼区間を羊水BNPの標準値とした。全ての解析において危険率0.05未満を有意とした。

6. 倫理的配慮

本研究は、「ヘルシンキ宣言」と「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認の下に行われた（臨床研究番号：自017-0256）。

研究の結果

1. 対象の背景

対象の妊娠週数は23週4日～42週0日(35.3±3.6)(平均±標準偏差)週、出生体重は260～4065(2212±750)g、羊水BNPは4.7～1081.0(平均 23.1)pg/mL、臍帯血BNPは2.7～11906.6(平均 48.3)pg/mLであった。対象の背景を表2に示す。

表2. 対象の背景

因子	有り (%)	無し (%)	不明 (%)
初産	224 (46.3%)	259 (53.5%)	1 (0.2%)
母体年齢 35 歳未満	297 (61.4%)	187 (38.6%)	0 (0.0%)
母体ステロイド	43 (8.9%)	412 (85.1%)	29 (6.0%)
帝王切開分娩	480 (99.2%)	4 (0.8%)	0 (0.0%)
多胎	207 (42.8%)	277 (57.2%)	0 (0.0%)
一絨毛膜二羊膜双胎	167 (34.5%)	317 (65.5%)	0 (0.0%)
双胎間輸血症候群	33 (6.8%)	451 (93.2%)	0 (0.0%)
FLP	19 (3.9%)	465 (96.1%)	0 (0.0%)
男児	228 (47.1%)	256 (52.9%)	0 (0.0%)
SGA	133 (27.5%)	351 (72.5%)	0 (0.0%)
新生児仮死	71 (14.7%)	412 (85.1%)	1 (0.2%)
臍帯動脈血 pH 7.2 未満	28 (5.8%)	455 (94.0%)	1 (0.2%)
低血圧	72 (14.9%)	412 (85.1%)	0 (0.0%)
カテコラミン投与	66 (13.6%)	418 (86.4%)	0 (0.0%)
敗血症	5 (1.0%)	476 (98.3%)	3 (0.6%)
感染症	8 (1.7%)	475 (98.1%)	1 (0.2%)

母体ステロイド；分娩前母体ステロイド投与、FLP；胎児鏡下レーザ凝固術、SGA；妊娠週数に比して小さい体重

2. 臍帯血BNPと羊水BNPの関係

臍帯血BNPの常用対数と羊水BNPの常用対数の間には正の相関(n=440, r=0.440, p<0.001)が認められた(図5)。

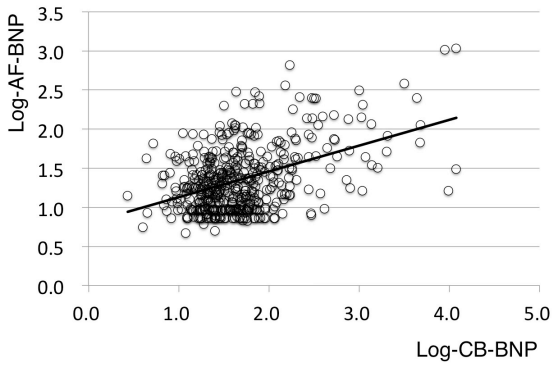


図5. 臍帯血BNPと羊水BNPの関係

直線は回帰直線を示す。

Log-CB-BNP；臍帯血BNPの常用対数、Log-AF-BNP；羊水BNPの常用対数

3. 母体因子と羊水BNPの関係

高い羊水BNPと関連する母体因子として、35歳未満の母体年齢、母体ステロイド、多胎、双胎間輸血症候群が選択された(表3)。

表3. 母体因子と羊水BNPの関係

因子	有り			無し			p
	n	平均	95%CI	n	平均	95%CI	
初産	224	24.0	(21.1-27.3)	259	23.1	(20.6-26.0)	0.452
母体年齢 35 歳未満	297	24.9	(22.1-28.0)	187	21.5	(19.1-24.3)	0.025
母体ステロイド	43	35.6	(25.2-50.1)	412	21.3	(19.5-23.2)	0.032
帝王切開分娩	480	23.4	(21.5-25.6)	4	42.2	(22.7-78.5)	0.403
多胎	207	24.2	(34.4-46.7)	277	22.3	(21.4-28.6)	0.371
一絨毛膜二羊膜双胎	167	20.3	(17.5-23.6)	317	25.4	(22.9-28.2)	0.454
双胎間輸血症候群	33	64.9	(44.0-95.7)	451	21.9	(20.1-23.8)	0.010
FLP	19	57.9	(34.0-98.7)	465	22.7	(20.8-24.7)	0.149

95%CI；95%信頼区間、母体ステロイド；分娩前母体ステロイド投与、FLP；胎児鏡下レーザ凝固術

4. 新生児因子と羊水BNPの関係

高い羊水BNPと関連する新生児因子として、男児、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満、低血圧が選択された(表4)。

表4. 新生児因子と羊水BNPの関係

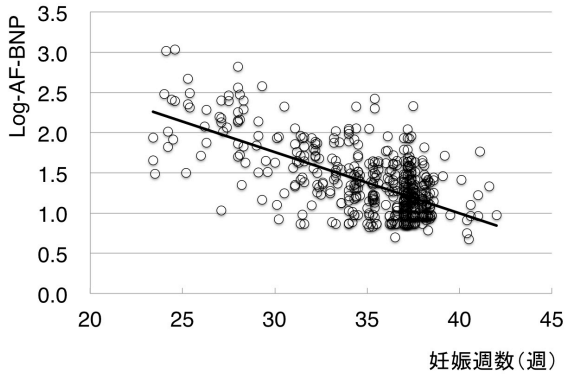
因子	有り			無し			p
	n	平均	95%CI	n	平均	95%CI	
男児	228	27.8	(24.3-31.8)	256	20.3	(18.2-22.6)	0.038
SGA	133	28.8	(23.9-34.6)	351	21.8	(19.8-24.0)	0.009
新生児仮死	71	62.1	(46.3-83.2)	412	20.0	(18.5-21.6)	<0.001
臍帯動脈血 pH 7.2 未満	28	33.2	(20.6-53.4)	455	23.1	(21.2-25.2)	0.052
低血圧	72	78.0	(61.4-99.1)	412	19.1	(17.7-20.6)	0.002
カテコラミン投与	66	78.0	(61.5-99.0)	418	19.5	(18.0-21.1)	0.032
敗血症	5	63.1	(43.3-92.0)	476	23.3	(21.3-25.4)	0.068
感染症	8	35.5	(18.4-68.3)	475	23.3	(21.4-25.5)	0.946

95%CI；95%信頼区間、SGA；妊娠週数に比して小さい体重

5. 妊娠週数と羊水BNPの関係

妊娠週数と羊水BNPの常用対数は負の相関を示した(n=484, r=−0.644, p<0.001)(図6A)。男児の方が女児より羊水BNPが高いため、男女別に解析したところ、男児(n=228, r=−0.692, p<0.001)、女児(n=256, r=−0.608, p<0.001)それぞれで、羊水BNPの常用対数と妊娠週数は負の相関を示した(図6B)。

(A)



(B)

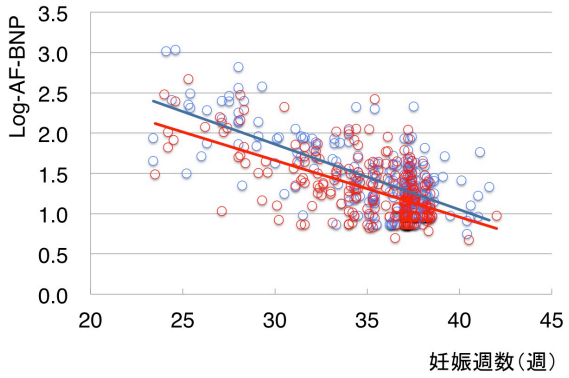


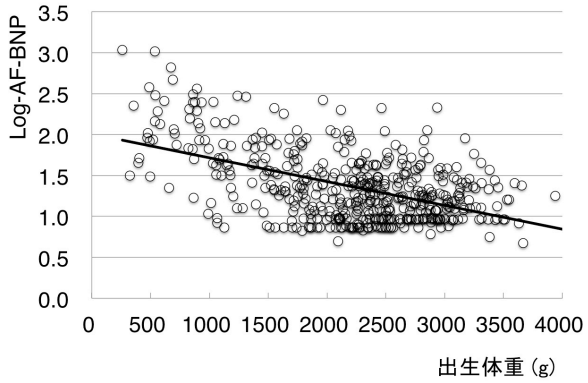
図6. 妊娠週数と羊水BNPの関係

(A)は全体、(B)は男女別のグラフ。直線は回帰直線を示す。
青線；男児、赤線；女児、Log-AF-BNP；羊水BNPの常用対数

6. 出生体重と羊水BNPの関係

出生体重と羊水BNPの常用対数は負の相関を示した(n=484, r=−0.513, p<0.001)(図7A)。男児の方が女児より羊水BNPが高いため、男女別に解析したところ、男児(n=228, r=−0.576, p<0.001)、女児(n=256, r=−0.494, p<0.001)それぞれで、出生体重と羊水BNPの常用対数とは負の相関を示した(図7B)。

(A)



(B)

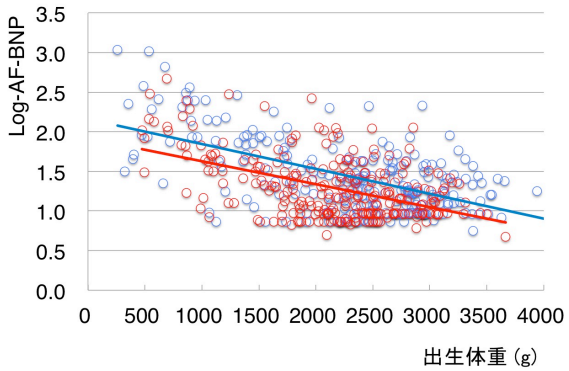


図7. 出生体重と羊水BNPの関係

(A)は全体、(B)は男女別のグラフ。直線は回帰直線を示す。

青線；男児、赤線；女児、Log-AF-BNP；羊水BNPの常用対数

7. 多変量解析

単変量解析で羊水BNPと有意な関係が認められた35歳未満の母体年齢、母体ステロイド、多胎、双胎間輸血症候群、男児、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満、低血圧、妊娠週数、出生体重の11因子を独立変数、羊水BNPの常用対数を従属変数としてステップワイズ回帰解析を行ったところ、高い羊水BNPに関連する独立した因子として、短い妊娠週数、男児、低血圧が抽出された(表5)。

表5. ステップワイズ回帰解析

因子	β	p
妊娠週数(週)	-0.511	<0.001
男児	0.162	<0.001
低血圧	0.182	<0.001

β ; 標準回帰係数

8. 抽出された因子と交絡因子の関係

単変量解析で羊水BNPとの間に有意な関係が認められた11因子のうち、多変量解析の結果、短い妊娠週数、男児、低血圧の3因子が抽出された。残りの8因子(35歳未満の母体年齢、母体ステロイド、多胎、双胎間輸血症候群、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満、出生体重)は抽出された3因子と交絡していると考えられたため、抽出された3因子と他の8因子の関係について検討した。

1) 妊娠週数と交絡因子の関係

妊娠週数と出生体重の間には強い相関(n=484, r=0.873, p<0.001)が認められた(図8)。

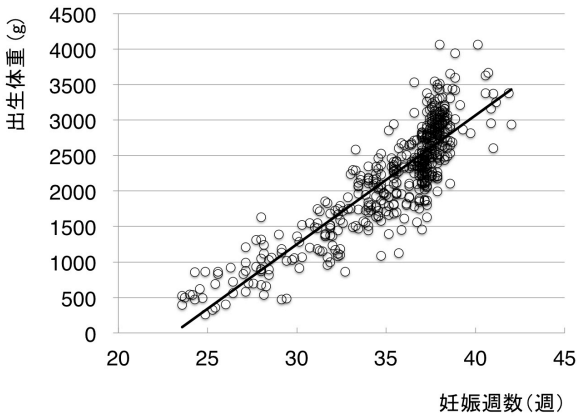


図8. 妊娠週数と出生体重の関係

直線は回帰直線を示す。

妊娠週数と他の7因子の関係を示す(表6)。母体ステロイド、多胎、双胎間輸血症候群、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満の有る児の妊娠週数はそれぞれの因子が無い児に比べて妊娠期間が短かった。

表6. 妊娠週数と交絡因子の関係

因子	有り		無し		p
	n	平均±標準偏差	n	平均±標準偏差	
母体年齢 35 歳未満	187	35.5±3.6	297	35.2±3.7	0.797
母体ステロイド	43	31.9±4.1	412	35.9±3.3	0.009
多胎	207	35.2±3.1	277	35.4±3.9	<0.001
双胎間輸血症候群	33	30.6±4.2	451	35.6±3.3	0.001
SGA	133	34.0±4.0	351	35.8±3.3	<0.001
新生児仮死	71	30.4±4.4	412	36.1±2.7	<0.001
臍帯動脈血 pH 7.2 未満	28	34.1±4.9	455	35.4±3.5	0.001

母体ステロイド；分娩前母体ステロイド投与、SGA；妊娠週数に比して小さい体重

2)　性別と交絡因子の関係

出生体重(平均±標準偏差)は女児(2137±666)gより男児(2294±831)gの方が大きかった(p=0.001)。性別と他の7因子の間には有意な関係は認められなかった(表7)。

表7. 性別と交絡因子の関係

因子	男児	(%)	女児	(%)	p
母体年齢 35 歳未満	86/228	37.7%	101/256	39.5%	0.709
母体ステロイド	22/215	10.2%	21/240	8.8%	0.632
多胎	92/228	40.4%	115/256	44.9%	0.313
双胎間輸血症候群	21/228	9.2%	12/256	4.7%	0.069
SGA	59/228	25.9%	74/256	28.9%	0.477
新生児仮死	38/228	16.7%	33/256	12.9%	0.250
臍帯動脈血 pH 7.2 未満	18/228	7.9%	10/256	3.9%	0.078

母体ステロイド；分娩前母体ステロイド投与、SGA；妊娠週数に比して小さい体重

3)　低血圧と交絡因子の関係

出生体重(平均±標準偏差)は低血圧を認めなかった児(2387±621)gより低血圧を認めた児 (1209±642)gで有意に小さかった(p<0.001)。低血圧を認めた児では、母体ステロイド、双胎間輸血症候群、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満が有意に多かった (表8)。

表8. 低血圧の有無と交絡因子の関係

因子	有り	(%)	無し	(%)	p
母体年齢 35 歳未満	25/72	34.7%	162/412	39.3%	0.513
母体ステロイド	12/63	19.0%	31/392	7.9%	0.009
多胎	36/72	50.0%	171/412	41.5%	0.198
双胎間輸血症候群	21/72	29.2%	12/412	2.9%	<0.001
SGA	30/72	41.7%	103/412	25.0%	0.006
新生児仮死	43/72	59.7%	28/412	6.8%	<0.001
臍帯動脈血 pH 7.2 未満	8/72	11.1%	20/412	4.9%	0.036

母体ステロイド；分娩前母体ステロイド投与、SGA；妊娠週数に比して小さい体重

9. 羊水BNPの基準値

羊水BNPに影響する因子が妊娠週数、性別、生後の低血圧の有無に集約されたことから、生後に低血圧を認めなかった412例を男女に分け、妊娠週数ごとの基準値を求めた。基準値は95%信頼区間の範囲とした。

症例数が10例以上あった妊娠34週から38週については基準値の上限を正常上限として使用可能と考えられた(表9)。羊水BNPの正常上限は男児の34週では50.1pg/mL、男児の38週では19.4pg/mL、女児の34週では36.3pg/mL、女児の38週では15.1pg/mLと計算された。

表9. 羊水BNPの基準値

週数	男児			女児		
	n	95%CI 下限	95%CI 上限	n	95%CI 下限	95%CI 上限
25	0	-	-	1	-	-
27	0	-	-	2	0.0	10^9
28	3	18.2	4045.8	2	10.4	192.8
29	1	-	-	3	7.0	123.6
30	3	4.9	274.8	3	0.4	2060.6
31	7	19.4	87.3	6	9.1	37.7
32	4	34.4	103.3	9	16.0	35.7
33	8	20.0	75.0	8	14.4	49.2
34	15	20.0	50.1	21	17.0	36.3
35	18	12.5	28.0	17	11.6	29.2
36	19	12.2	23.2	21	12.4	25.7
37	70	16.5	22.5	93	12.6	16.0
38	34	13.7	19.4	30	10.8	15.1
39	3	3.2	197.7	0	-	-
40	5	5.0	21.9	1	-	-
41	4	6.1	73.6	0	-	-
42	0	-	-	1	-	-

考察

臍帯血BNPと羊水BNPの間には正の相関(r=0.440, p<0.001)が認められた。これは先行研究の結果を裏付ける結果であった[18]。羊水の大部分は胎児の尿に由来し、BNPの血中濃度と尿中濃度が相関することから[17]、羊水中に存在するBNPの由来は胎児尿である可能性が高いと考えられる。しかし、Carvajalらは羊水中のBNPは羊膜細胞から分泌されると考察している[22]。

羊水BNPは妊娠週数に逆相関(r=-0.644, p<0.001)していた。前述のCarvajalらは、羊水BNPは妊娠週数が若いほど高く、満期に近くなるにつれ下降することは、BNPが子宮収縮抑制作用を持つことから合目的的であると考察している[22]。羊水BNPは出生体重と逆相関(r=-0.513, p<0.001)していた。これは、出生体重が妊娠週数と強く相関することを反映していると考えられた。

単変量解析の結果からは、35歳未満の母体年齢、母体ステロイド、多胎、双胎間輸血症候群、男児、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満、低血圧、妊娠週数、出生体重の11因子が羊水BNP高値と有意に関連していた。しかし、これらの因子は相互に複雑に関連している。多変量解析の結果からは、羊水BNP高値と関連する相互に独立した因子として、男児、短い妊娠期間、生後の低血圧が抽出された。男児は同じ妊娠週数の女児よりも出生体重が大きいが、妊娠週数とは独立して性別が抽出されたことから、性別自体に意味がある可能性が高い。胎児の性別が羊水BNP濃度に関連しているという報告は我々の知る限り過去にない。多変量解析の結果選択されなかった因子は、それぞれ選択された因子と関連しており、交絡因子であると考えられた。

双胎間輸血症候群、SGA、新生児仮死、臍帯動脈血pH 7.2未満などの胎児に心負荷を与えると考えられる因子は生後の低血圧に集約されたものと考えられる。新生児の血圧の正常値には定まったものがないが、妊娠週数が小さいほど血圧が低いことが知られている。今回は生後の低血圧を、平均血圧が妊娠週数の値を下回ったものと定義した[23-25]。

今回の検討では、過去の報告と同様に妊娠週数が若いほど羊水BNPが高かった。BNPに子宮収縮抑制作用があるという報告があり、早産期の羊水BNPが高いことは、妊娠の維持にとって有利である可能性がある。小児におけるBNPの経時変化については、出生時に高値を示した後新生児期以降は下降すると報告されている[26]。成人においては、BNPは加齢とともに上昇するが、これには腎機能の低下が影響していると推察されている[27]。

性別とBNPの関係に関しては、成人領域では男性よりも女性においてBNPが高いことが知られており、この機序の一つとしてテストステロンの関与が示唆されている[2]。小児については性差がないとしている文献が多いが、一方で思春期徴候が出現した女児で同年代の男児よりもBNPが高値であったという報告もある[28]。羊水BNPの性差について述べられた報告は過去にない。

今回我々は、羊水BNP濃度に影響する因子の解析を行い、生後の低血圧が羊水BNPと関連する独立した因子であることを明らかにした。そこで、生後に低血圧を呈した症例を除外して集計することにより、妊娠34～38週の児については羊水BNPの基準値を設定することが可能であった(表9)。この基準値を参考にすることで、羊水BNPを用いて胎児の心負荷を評価できる可能性がある。しかし、児の未熟性と胎児心負荷を総合的に勘案して妊娠継続の可否を決定する必要があるのは34週未満が主体である。34週未満における羊水BNPの基準値を設定するためには、34週未満で出生し生後に低血圧を呈さない症例の羊水BNP濃度集積が必要である。

総括および結論

- 羊水BNP高値と関連する因子として、男児、短い妊娠期間、生後の低血圧が抽出された。
- 妊娠34～38週については、男女別に週数ごとの羊水BNPの基準値を設定することが可能であった。
- 妊娠34～38週については、羊水を採取してBNP濃度を測定することで胎児の心負荷を評価ができる可能性がある。
- 児の未熟性と胎児心負荷を総合的に勘案して妊娠継続の可否を決定する必要があるのは34週未満が主体である。34週未満における羊水BNPの基準値を設定するためには、34週未満で出生し生後に低血圧を呈さない症例の羊水BNP濃度集積が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究にご協力を頂きました患者様とご家族に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さり、ご指導賜りました、北海道大学大学院医学研究院生殖・発達医学分野小児科学教室　有賀正教授、北海道大学病院周産母子センター長和俊診療教授に深く感謝致します。羊水の採取については、北海道大学大学院医学研究院生殖・発達医学分野産科学教室　森川守准教授を始め、産科学教室の先生方にご協力をいただきました。深く御礼申し上げます。また、様々な面から研究をサポートして下さいました、古瀬優太先生、秋元琢真先生、兼次洋介先生、池田雅彦先生、恩田哲雄先生に御礼申し上げます。

引用文献

1 Kangawa, K., Matsuo, H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun.* 118, 131-9(1984).

2 加藤公則. BNP, NT-proBNP 研究の最前線. 人間ドック 31, 541-549(2016).

3 Daniels, L. B. & Maisel, A. S. Natriuretic peptides. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 2357-2368(2007).

4 Weber, M. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart* 92, 843-849(2005).

5 Yandle, T. G., Richards, A. M. B-type Natriuretic Peptide circulating forms: Analytical and bioactivity issues. *Clinica Chimica Acta* 448, 195-205(2015).

6 Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K. & Dickey, D. M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol* 341-366(2009).

7 Semenov, A. G., Postnikov, A. B., Tamm, N. N., Seferian, K. R., Karpova, N. S., Bloshchitsyna, M. N., Koshkina, E. V., Krasnoselsky, M. I., Serebryanaya, D. V. & Katrukha, A. G. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem* 55, 489-498(2009).

8 Lumsden, N.,Khambata, R.,Hobbs, A. C-type natriuretic peptide (CNP) :cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr Pharm Des.* 16, 4080-4088(2010).

9 Nishikimi, T., Kuwahara, K., Nakao, K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *Journal of Cardiology* 57, 131-140(2011).

10 岸本一郎, 徳留健, 寒川賢治. ナトリウム利尿ペプチドとその受容体系を介する心臓・血管保護作用. 心臓 41, 1302-1307(2009).

11 de Lemos, J. A., McGuire, D. K., Drazner, M. H. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *The Lancet* 362, 316-322(2003).

12 石井潤. 虚血性心疾患の心筋ストレスマーカー(BNP、ANP、NT-proBNP). 生物試料分析 32, 135-144(2009).

13 Gruden, G., Landi, A. & Bruno, G. Natriuretic Peptides, Heart, and Adipose Tissue: ew Findings and Future Developments for Diabetes Research. *Diabetes Care* 37, 2899-2908(2014).

14 Cantinotti, M., Law, Y., Vittorini, S., Crocetti, M., Marco, M., Murzi, B. & Clerico, A. The potential and limitations of plasma BNP measurement in the diagnosis, prognosis, and management of children with heart failure due to congenital cardiac disease: an update. *Heart Fail. Rev.* 19, 727-742(2014).

15 Hsu, J. H., Yang, S. N., Chen, H. L., Tseng, H. I., Dai, Z. K. & Wu, J. R. B-type natriuretic peptide predicts responses to indomethacin in premature neonates with patent ductus arteriosus. *J. Pediatr.* 157, 79-84(2010).

16 Costa, V. N., Nomura, R. M., Miyadahira, S., Vieira Francisco, R. P. & Zugaib, M. Cord blood B-type natriuretic peptide levels in placental insufficiency: correlation with fetal Doppler and pH at birth. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 171, 231-234(2013).

17 Cortes, R., Rivera, M., Salvador, A., Garcia de Burgos, F., Bertomeu, V., Rosello-Lleti, E., Martinez-Dolz, L., Paya, R., Almenar, L. & Portoles, M. Urinary B-type natriuretic peptide levels in the diagnosis and prognosis of heart failure. *J. Card. Fail.* 13, 549-555 (2007).

18 Moriichi, A., Cho, K., Mizushima, M., Furuse, Y., Akimoto, T., Yamada, T. & Minakami, H. B-type natriuretic peptide levels at birth predict cardiac dysfunction in neonates. *Pediatr. Int.* 54, 89-93(2012).

19 Habli, M., Cnota, J., Michelfelder, E., Salisbury, S., Schnell, B., Polzin, W., Lim, F. Y. & Crombleholme, T. M. The relationship between amniotic fluid levels of brain-type natriuretic peptide and recipient cardiomyopathy in twin-twin transfusion syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203, 404 e401-407(2010).

20 Garofoli, F., Mannarino, S., Montanari, L., Cerbo, R., Tzialla, C. Mazzucchelli, I., Angelini, M., Codazzi, A., Mongini, M., Manzoni, P., Tinelli, C., Spinillo, A. & Stronati, M. Variation of B-type natriuretic peptide concentrations and intrauterine growth restriction: mother, fetus and newborn. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26, 733-739(2012).

21 Blohm, M. E., Arndt, F., Sandig, J., Diehl, W., Zeller, T., Mueller, G. C., Schlesner, C., Mir, T. S., Blankenberg, S., Hecher, K., Singer, D. & Weil, J. Cardiovascular biomarkers in paired maternal and umbilical cord blood samples at term and near term delivery. *Early Hum. Dev.* 94, 7-12(2016).

22 Carvajal, J. A., Ferrer, F. A., Araya, F. I. & Delpiano, A. M. Normal amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) values in amniotic fluid. *Clin. Biochem.* 50, 23-26(2017).

23 Stranak, Z., Semberova, J., Barrington, K., O'Donnell, C., Marlow, N., Naulaers, G., Dempsey, E. & consortium, H. I. P. International survey on diagnosis and management of hypotension in extremely preterm babies. *Eur. J. Pediatr.* 173, 793-798(2014).

24 Dempsey, E. M. & Barrington, K. J. Diagnostic criteria and therapeutic interventions for the hypotensive very low birth weight infant. *J. Perinatol.* 26, 677-681(2006).

25 a Joint Working Group of the British Association of Perinatal Medicine and the Research Unit of the Royal College of Physicians, Development of audit measures and guidelines for good practice in the management of neonatal respiratory distress syndrome. Report of a Joint Working Group of the British Association of Perinatal Medicine and the Research Unit of the Royal College of Physicians. *Archives of disease in childhood* 67, 1221-1227(1992).

26 Nir, A., Lindinger, A., Rauh, M., Bar-Oz, B., Laer, S., Schwachtgen, L., Koch, A., Falkenberg, J. & Mir, T. S. NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children: reference values based on combined data from four studies. *Pediatr Cardiol* **30**, 3-8(2009).

27 Kato, J., Kitamura, K., Uemura, T., Kuwasako, K., Kita, T., Kangawa, K. & Eto, T. Plasma levels of adrenomedullin and atrial and brain natriuretic peptides in the general population: their relations to age and pulse pressure. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **25**, 887-892 (2002).

28 Koch, A. & Singer, H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart* **89**, 875-878 (2003).