

慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬での
右心系心エコー図検査パラメータおよび肺動脈圧の関連性
ならびにシルデナフィルの薬物動態/薬力学に関する研究

(Study on relationship between right heart echocardiographic
parameters and pulmonary artery pressure, and pharmacokinetics /
pharmacodynamics of oral sildenafil in a canine model of
chronic embolic pulmonary hypertension)

赤羽根僚太

慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬での
右心系心エコー図検査パラメータおよび肺動脈圧の関連性
ならびにシルデナフィルの薬物動態/薬力学に関する研究

(Study on relationship between right heart echocardiographic
parameters and pulmonary artery pressure, and pharmacokinetics /
pharmacodynamics of oral sildenafil in a canine model of
chronic embolic pulmonary hypertension)

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成 28 年入学

赤羽根僚太

(指導教授：竹村直行)

令和 2 年 3 月

目次

第1章 序論.....	1
第2章 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬における右心系心エコー図検査パラメータおよび 観血的な肺動脈圧測定値の関連性の評価.....	6
1. 緒言.....	7
2. 材料および方法.....	7
3. 結果.....	15
4. 考察.....	23
5. 小括.....	25
第3章 臨床的に健康なイヌに単回経口投与したシルデナフィルの薬物動態 ：食事の影響および用量比例性の評価.....	26
1. 緒言.....	27
2. 材料および方法.....	27
3. 結果.....	30
4. 考察.....	35
5. 小括.....	36
第4章 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬に単回経口投与したシルデナフィルの 薬物動態.....	38
1. 緒言.....	39
2. 材料および方法.....	39

3. 結果.....	42
4. 考察.....	47
5. 小括.....	48

第5章 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬の血行動態に対するシルденаフィルの短期的

効果の評価.....	49
1. 緒言.....	50
2. 材料および方法.....	50
3. 結果.....	52
4. 考察.....	61
5. 小括.....	62

第6章 総括.....	63
参考文献.....	69
謝辞.....	81

第 1 章

序論

肺高血圧症 (PH) は、肺動脈圧 (PAP) の上昇を特徴とする進行性の疾患であり、イヌでの診断および治療に関し、昨今注目が増している [41, 42]。PH の分類に関して、イヌの PH は、PAP を上昇させる主病態の所在により、前毛細血管性または後毛細血管性 PH に分類することができる [45]。また、ヒトでの分類に準じて、原因疾患あるいは機序により以下の 5 つの分類を用いることもある; 1) 肺動脈性肺高血圧症 (PAH)、2) 左心疾患に起因する PH、3) 肺疾患または低酸素に起因する PH、4) 血栓および/または塞栓性疾患による PH および 5) 混合型 PH [12, 27, 28, 34, 43, 55, 63, 76]。ただし、PH が必ずしもこれら 5 つのどれか 1 つに分類できるわけではなく、原因によっては複数の型を併発しているものもある (例えばイヌ糸状虫は 1 および 4 型 PH の併発と捉えることができる)。イヌでの自然発生性 PH に関して、いくつかの研究により PH の原因疾患およびその割合が明らかとなっているが、その中でも左心疾患、特に粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) がイヌの PH の最も多い原因と認識されており、これはヒトの PH と同様の特徴である [6, 12, 32, 33, 69, 72, 79, 94]。さらに、いくつかの研究によると、MMVD 罹患犬全体の約 14–65 % が PH を併発しており、その割合は病期が進むごとに増加することが示されている [5, 34, 45, 87]。

イヌの PH の病態の主体は、ヒトと同様、肺動脈内腔の狭窄および閉塞で、概ね以下に述べる変化により生じると考えられている。1 つ目は血管収縮因子および血管拡張因子の不均衡により生じる過剰な血管収縮で、エンドセリン、プロスタノイド類 (プロスタサイクリンおよびトロンボキサン) および一酸化窒素 (NO) といった生体内メディエータの関与が想定されている [23, 49, 67, 70, 90]。肺炎、肺水腫および肺血栓塞栓症患者では、低酸素性肺血管攣縮による肺動脈の過剰収縮も病態発生に関与しているとされる [45, 46]。2 つ目として血管内皮細胞、平滑筋細胞および筋線維芽細胞などの過剰増殖による中膜肥厚、内皮増殖、そして肺血管コンプライアンスの低下といった血管リモデリングが挙げられ、これらにも上記メディエータが関与していると考えられている [45, 46, 85]。そして 3 つ目は肺血管系における凝固系異常による血栓形成である [33]。また、上記とは別に、左心疾患に起因した PH は、上昇した左房圧の肺動脈への受動的伝播により生じると考えられ、一部の患者では、左房圧の受動的伝播に加え、肺動脈の機能的収縮および/または肺血管リモデリングが生じ、伝播した圧以上に PAP が上昇する [12, 46, 85]。ヒト医学と同様、獣医学でも心疾患のイヌにおける神経体液性因子の活性化、サイトカインの産生、低酸素および遺伝的要因により生じる血管

内皮障害が関与していると考えられており、上述した生体内メディエータの不均衡を報告している研究もある[33, 54, 69, 72, 85]。こうした状況下で、右室は肥大することで上昇した PAP に対応するが、次第に拡大し、最終的には右心不全へと至る[35, 58, 75, 99, 100, 102]。ヒトおよび獣医学で、予後に対する PH および右心不全の悪影響が報告されており、PH の早期診断および適切な治療介入は、罹患動物の予後の悪化を防ぐうえで極めて重要である[5, 7, 27, 54, 87]。

PH の診断に関して、ヒトでは局所麻酔のみで右心カテーテル検査(RHC)による意識下での PAP 測定が可能であり、安静時に平均 PAP が 25 mmHg を超えた場合に PH と診断する[71]。獣医学でもヒトと同様、イヌの PH を診断するゴールドスタンダードは観血的な PAP 測定であり、RHC が必要不可欠である[41, 42, 45]。しかしヒトと違い、局所麻酔のみでイヌに RHC を実施することは現実的に不可能であり、RHC 実施に際し全身麻酔または中程度以上の鎮静が必要となる。心疾患を有したイヌに全身麻酔を施すこと自体に高いリスクを伴い、費用および合併症の存在も考慮すると、RHC を実施できる機会は極めて少なくなる。こうした現状で、獣医臨床現場ではほぼ全ての PH を心エコー図検査により算出した圧較差にもとづいて診断している[46, 85]。具体的には、心エコー図検査の連続波ドプラ法で三尖弁逆流(TR)および/または肺動脈弁逆流(PR)血流速を測定し、これらと簡易ベルヌーイ式(圧較差[mmHg] = $4 \times \text{逆流血流速}[\text{m/s}]^2$)を用いることで三尖弁逆流圧較差(TRPG)または肺動脈弁逆流圧較差(PRPG)を算出する[103]。論文により数値に多少の差があるが、獣医学では概ね TRPG > 30 mmHg および/または PRPG > 20 mmHg を満たした際に PH と臨床診断する[37, 41, 85]。心エコー図検査の利点として、RHC と異なり、動物への侵襲度が著しく低いことが挙げられる。加えて、検査を実施するにあたり、よほど非協力的な動物を除いて、鎮静を施す必要がなく、動物に苦痛を与えることなく繰り返し測定することが可能である。そのため獣医学では、これら圧較差が PH の診断のみならず、重症度や病態評価にも用いられている[42, 68, 79, 81]。ヒト医学でも、心エコー図検査を用いた圧較差の推定は、PH のスクリーニングツールとして頻繁に用いられている[14, 74]。しかし、この推定法の性質上、測定した逆流血流速の値によっては、実際の PAP との間に大きな誤差を生じる可能性がある。現にヒトおよび獣医学で、心エコー図検査による推定値および RHC による測定値間の不一致を報告する研究がある[16, 21, 22, 31, 84]。また、最近のヒトの報告では、PH

患者であっても必ずしも TR が発生しないことが判明し、TR および/または PR の発生を前提として PH の診断および病態評価をしている獣医学では、PH 発症時以外にも測定できる検査パラメータの必要性が高まっている[62]。

近年ヒト医学では、これまであまり注目されてこなかった肺動脈および右室といった右心系の構造や機能に着目した心エコー図検査パラメータがいくつか提唱されており、これらを用いることで PAP 上昇およびそれに関連した病態の評価が可能になると期待されている[14, 74]。獣医学でもヒト医学に倣い、右心系に着目した検査パラメータの有用性を検証した研究が報告されつつある[4, 96, 97]。しかし前述したように、獣医学では RHC の実施が困難であり、提唱されている右心系心エコー図検査パラメータが RHC で実際に測定した PAP とどれほどの関連性を持ち、どの程度病態を反映するかはほとんど明らかになっていない。

次に PH の治療に関し、最も優先して行われるべきは、PH の原因となった基礎疾患の治療強化である[45]。具体的には、左心疾患由来の PH であれば、利尿薬および/または強心薬の増量、肺疾患に続発した PH であれば、酸素吸入および/または抗炎症薬の投与、血栓塞栓による PH であれば、抗凝固薬の投与などである[44, 45]。しかし、これらを実施してもなお改善が認められない場合、もしくは PAH が疑われる場合には、肺血管を特異的に拡張させる薬剤を投与する必要がある。代表的な肺血管拡張薬には、上述の生体内メディエータを抑制あるいは増強することで薬理作用を発揮するものが含まれ、ボセンタンやアンブリセンタンといったエンドセリン受容体拮抗薬、プロスタサイクリン製剤であるベラプロストナトリウムおよびエポプロステノール、ホスホジエステラーゼ (PDE)-5 を阻害することで NO に始まる血管拡張作用を維持するシルデナフィルやタダラフィルなどが挙げられる[9, 13, 24-27, 50, 77, 80]。しかしこれらのうち、シルデナフィルやタダラフィルを除く薬剤は、極めて高い薬価、投薬頻度および投与経路といった理由により、獣医学ではほとんど用いられておらず、我々の知る限り、その有効性を評価した研究報告はない。

シルデナフィルは高い選択性を有する PDE-5 阻害薬で、血管平滑筋細胞内において、NO によって産生された環状グアノシンーリン酸 (cGMP) が PDE-5 により分解されるのを抑え、cGMP を介した各種リン酸化を促進し、細胞内カルシウム濃度を低下させることで血管平滑筋を持続的に弛緩させる作用を持つ[11, 25]。獣医学では、多くの研究が PH のイヌに

経口投与したシルデナフィルが臨床徴候および生活の質(QOL)を改善させ、心エコー図検査により算出した TRPG を低下させることを報告している[3, 7, 47, 48, 57, 59, 92, 93]。

シルデナフィルをはじめ、あらゆる薬剤の投与に際し、薬物動態特性の理解は、投与量および投与頻度を決定する上で極めて重要となる。ヒトでは、経口的に摂取したシルデナフィルの薬物動態に対する食事の影響が調査されており、シルデナフィルを服用する際の注意事項として認識されている[60]。そして、様々な用量でこの薬剤を摂取した際の用量比例性も評価されており、投与量変更の際に考慮されている[60]。加えて、最近では、PHをはじめとした種々の心疾患を原因とした心不全患者での様々な薬剤の薬物動態変化が報告されつつあり、より適切な治療介入を行うための基礎的な情報が増えつつある[38, 51, 61]。いっぽう獣医学では、イヌに経口投与したシルデナフィルの薬物動態に関する研究は非常に限られており、PHの影響はおろか、食事の影響や用量比例性の有無すら評価されていないのが現状である。

また、シルデナフィルの薬力学的作用に関し、実験的に精製された注射薬をイヌに静脈内投与し、観血的に測定した PAP の低下程度を調べた研究はあるが、実際の臨床現場で使用するシルデナフィルの有効性を RHC などを用いて定量的に評価した研究はない[17-19, 83]。そのため、様々な用量のシルデナフィルが用量依存性に薬効の増強を示すかは明らかでなく、薬価の高いシルデナフィルを使用するご家族の経済的負担をできる限り軽減するうえでも、これらを明らかにする必要がある。

以上より、本研究の第2章では、イヌの PH モデルを作製し、PH の検出または病態評価に有用と期待されている右心系心エコー図検査パラメータおよび RHC で実際に測定した PAP との関連性を評価した。続いて第3章では、健康なイヌでのシルデナフィルの薬物動態を評価し、食事がシルデナフィルの薬物動態に与える影響、そして用量比例性の有無を調査した。そして第4章では、PH のイヌでのシルデナフィルの薬物動態を調査し、PH が薬物動態に与える影響および用量比例性を評価した。最後に第5章では、PH モデルの肺および全身血行動態に対するシルデナフィルの影響を定量的に評価し、実際の症例への用量を決定する際の基礎的な情報を提供することを目的とした。

第2章

慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬での
右心系心エコー図検査パラメータおよび
観血的な肺動脈圧測定値の関連性の評価

1. 緒言

獣医学では、肺高血圧症(PH)は収縮期肺動脈圧(sPAP)が 30 mmHg かつ平均肺動脈圧(mPAP)が 20 mmHg 以上と定義され、診断には右心カテーテル検査(RHC)が必須である[37, 41, 91]。ヒトではRHCは局所麻酔のみで実施可能であり、頻繁に実施できる検査だが、動物では全身麻酔が必要となり、費用、麻酔リスク、高い侵襲性および合併症の危険性から、実施されることは稀である。そのため、実際の臨床現場では、PH は心エコー図検査で測定した三尖弁(TR)または肺動脈弁逆流(PR)血流速から算出した逆流圧較差(TRPG または PRPG)にもとづき診断されており、重症度分類、病態評価、そして治療反応の評価にもこれらの推定値が用いられている[45, 68, 79, 81]。しかし、最近のヒトの研究では、PH 患者の約 30%で TR が存在しないことが示されている[62]。また、急性 PH のモデル犬を用いた最近の研究において、TRPG は sPAP を正確には推定できず、変動も無視できないほどだったことを示した[84]。したがって、イヌでの上昇した PAP の検出ならびにそれに関連した病態評価に使用できる新たな心エコー図検査パラメータが必要と考えられる。

近年、PH のイヌで右心系の構造や機能に関連した心エコー図検査パラメータがいくつか提唱されており、PAP の上昇に関連した病態の評価に役立つと期待されている。具体的には、肺動脈/大動脈内径比(PA/Ao)、三尖弁輪収縮期移動距離(TAPSE)、肺動脈血流の加速時間/駆出時間比(AT/ET)、右室分画面積変化率(RVFAC)、右肺動脈伸展指数(RPAD)および拡張期右室内径(RVIDd)が挙げられるが、これらを検証した研究では、心エコー図検査から得た TRPG にもとづいて PH を診断している[4, 36, 64, 66, 81, 95, 98]。しかし、現時点で上記のパラメータおよび RHC で実際に測定した PAP との関連性を評価した研究は極めて少ない。

以上より本章では、慢性 PH モデルを用いて、PH 前後での右心系心エコー図検査パラメータおよび観血的な PAP の関連性を調査した。

2. 材料および方法

本学獣医内科学研究室第二で管理している臨床的に健康な雌のビーグル犬 5 頭(2-7 歳、8.3-10.5 kg)を用いた。イヌは 1 頭ずつ個別にケージで飼育し、市販のドライフードを給与して管理した。本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て本実験を行った(承

認番号 30S-36)。

RHC および慢性塞栓性肺高血圧症 (CEPH) モデル作製

プロポフォール (6 mg/kg、IV) を用いて導入したイヌに挿管を行い、同剤の持続点滴 (0.1–0.2 mg/kg、IV) で麻酔を維持した [8, 86]。横臥位にした麻酔下のイヌの頸静脈に 4 Fr のシース (Catheter Introducer, Medikit, Japan) を経皮的に設置し、4 Fr のカテーテル (Wedge Pressure Catheter, Harmac Medical Products, USA) を挿入した。較正済みの圧トランスデューサにカテーテルを接続し血圧を測定しつつ、右房および右室を経て肺動脈へと進めた。肺動脈まで達した後、プロポフォールの注入を止め、イヌを覚醒させた。その後 60–90 分間安置し、自力歩行を確認した後、横臥位にて sPAP、mPAP および拡張期 PAP (dPAP) を計測した。心エコー図検査実施者とは異なる測定者が PAP 測定を実施し、計測した PAP は、測定に影響しないよう心エコー図検査実施者には伏せられた。

CEPH モデルは過去の報告にもとづき、カテーテルから直径 100–300 μm のマイクロスフェア (Sephadex, GE Healthcare, USA) を間欠的に注入することで作製した [36, 73]。sPAP が 50 mmHg になるようマイクロスフェアの注入量を調整した。以前の報告と同様、数日で PAP の低下が見られたため、上記の処置を約 1 週間に 1 回の頻度で実施し、sPAP および mPAP がそれぞれ 30 および 20 mmHg を超えるまで徐々に PAP を上昇させた [73]。そして、sPAP および mPAP がそれぞれ 30 および 20 mmHg を超えた状態を少なくとも 3 ヶ月間維持したのち、作製後の心エコー図検査を実施した。

心エコー図検査

モデル作製前後で、心エコー図検査を実施した。心エコー図検査は RHC の前に実施し、同一の測定者が Xario SSA-660A ultrasound system (Canon Medical

95 Systems) および 5.0 MHz のセクタランスデューサを使用して、心電図を同時に記録しながらすべての計測を行った。無鎮静のイヌを横臥位で保定して検査を実施した。

評価した心エコー図検査パラメータは、PA/Ao、RVFAC、B モード右肺動脈伸展 (RPAD_{B-mode}) 指数、M モード RPAD 指数 (RPAD_{M-mode})、体重で標準化した RVIDd (RVIDdn)、体重で標準化した TAPSE (TAPSEn)、収縮期および拡張期の偏心率 (EI)、TR 血流速、TRPG、

最大肺動脈弁逆流速(peak PR)、peak PR を用いた肺動脈弁逆流圧較差(peak PRPG)、終末肺動脈弁逆流速(end PR)、endPR を用いた肺動脈弁逆流圧較差(end PRPG)、肺動脈(PA)流速、AT/ET、肺動脈弁の速度時間積分値(VTI)、心拍出量(CO)、三尖弁拡張早期血流速(E 波)、三尖弁拡張後期血流速(A 波)および E/A 比である。

PA/Ao は、右側傍胸骨心基部短軸像で拡張末期に閉鎖した肺動脈弁直下の主肺動脈内径を、同じ時相の大動脈内径で除することで算出した(図 2-1) [81]。RVIDd は、右側傍胸骨心基部短軸像の腱索レベルを用いて M モード法で測定した [4, 36]。TAPSE は、左側傍胸骨心尖部四腔像で描出した右室自由壁側の三尖弁輪を通過するように M モードカーソルを配置し、弁輪部の拡張末期から収縮末期までの心尖部方向の移動距離として測定した(図 2-2) [64, 66]。三尖弁輪を描出する際、右室の動きが M モードカーソルと平行になるように注意した。過小評価を避けるため、M モードカーソルが三尖弁の縦方向の変位と可能な限り平行になるように注意した。RVFAC は、拡張および収縮末期に左側傍胸骨心尖部四腔像で描出した右室の心内膜辺縁をトレースすることで取得した右室拡張末期面積(RVEDA)および右室収縮末期面積(RVESA)を用いて、以下の式から算出した(図 2-3) :RVFAC (%) = [(RVEDA - RVESA) / RVEDA] × 100 [4, 96]。RPAD 指数は、M モード法および B モード法の両者によって測定した。M モード法を用いた方法では、右側傍胸骨長軸流入路像で描出した左房頭側の右肺動脈の中央に M モードカーソルを配置し、右肺動脈の収縮期の最大内径(RPAs) および拡張期の最小内径(RPAd)を leading edge to leading edge 法で測定した(図 2-4) [95]。B モードを用いた方法では、右側傍胸骨心基部短軸像で肺動脈分岐部より遠位の右肺動脈を描出し、心電図波形上の T 波の前後で右肺動脈内径が最大になる時相で RPAs を、そして QRS 群の開始時に RPAd を測定した(図 2-5) [98]。RPAD 指数は、以下の式から算出した :RPAD 指数 (%) = [(RPAs (mm) - RPAd (mm)) / RPAs (mm)] × 100。EI は、心室中隔の扁平化を評価するために、右側傍胸骨短軸像の腱索レベルで測定した心室中隔に平行な左室の幅を、これに垂直な左室の高さで除することで、収縮期および拡張期のそれぞれで算出した(図 2-6) [4]。なお、RVIDdn および TAPSEn の算出には、以下に示す式を用いた [15, 91]。

$$RVIDdn = RVIDd(\text{mm}) \div \text{体重}(\text{kg})^{0.33}$$

$$TAPSEn = TAPSE(\text{mm}) \div \text{体重}(\text{kg})^{0.33}$$

AT/ET に関して、肺動脈のドプラ法血流波形の開始から最大血流速度までの時間を AT、血流波形の開始から終了までを ET として算出した(図 2-7) [45, 78]。三尖弁の E および A 波は左側傍胸骨長軸像で測定し、E/A を算出した。VTI は、肺動脈のドプラ法血流波形をトレースすることで取得した[88]。CO は、VTI に心拍数、そして肺動脈弁レベルでの肺動脈の内径から求めた肺動脈の面積を乗じることで算出した[88]。TR 流速の測定は、右側傍胸骨長軸流入路像、右側傍胸骨心基部短軸像、左側傍胸骨心尖部四腔像および左側傍胸骨心基部短軸像の 4 種類の断面に加え、トランスデューサに最も近い位置に右室が、最も遠い位置に右房および前後の大静脈の開口部が、そしてその中間に三尖弁が描出されるように調整した、標準的でない右側傍胸骨心基部短軸像を含む 5 種類の断面で行い、最大流速を統計解析に使用した[4]。peak PR として PR の最大流速を、そして end PR として拡張末期の流速を測定した。TR および PR の測定には連続波ドプラ法を使用し、そして TR および PR 逆流が超音波ビームと可能な限り平行になるように注意した。TRPG、peak PRPG および end PRPG は、それぞれ TR、peak PR および end PR から簡易ベルヌーイ式 (圧較差[mmHg] = $4 \times$ 逆流血流速度[m/s]²) を用いて算出した[103]。

TR、peak PR および end PR 以外のパラメータは 3 相の連続した心周期で測定し、これらの平均値を統計解析に使用した。

変動性の評価

1 頭のイヌを用いて、CEPH 作製前(BL) および CEPH 作製後の各心エコー図検査パラメータの測定者内変動を評価した。各パラメータを計 3 回測定し、以下の式から変動係数を算出した; 変動係数(%) = (標準偏差 ÷ 平均) × 100。その結果、健康時および CEPH 時でほぼ全ての心エコー図検査パラメータの CV 値が 10 %未満だったが、CEPH 時の RVFAC および RPAD はそれぞれ 27.1 および 14.9 %だった。

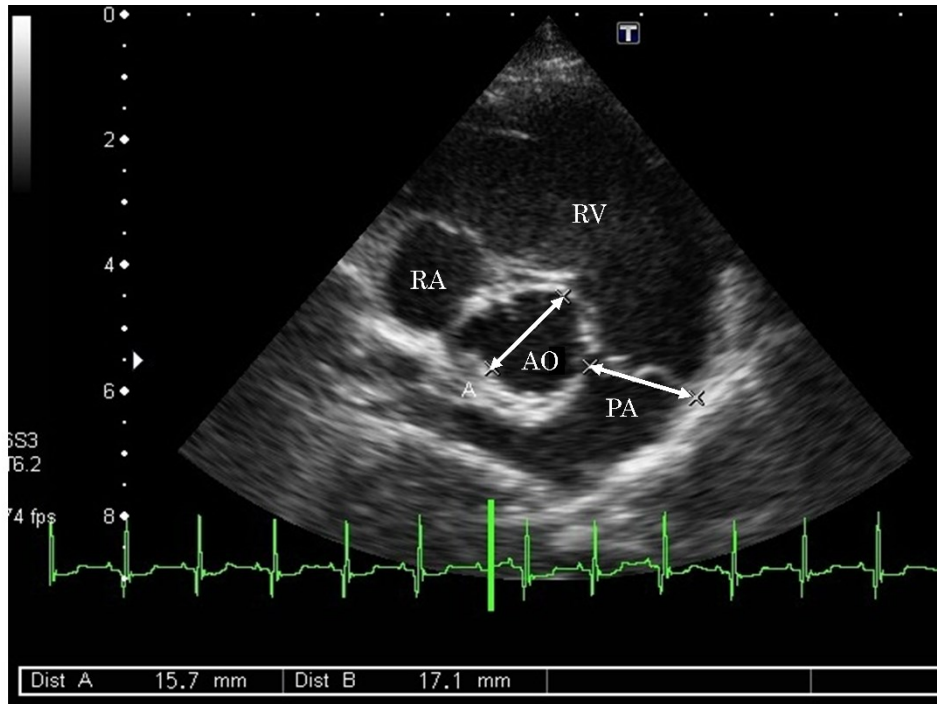


図2-1. 右側傍胸骨心基部短軸像での肺動脈/大動脈内径比(PA/Ao)の測定
 Ao 大動脈; RA 右房; RV 右室; PA 肺動脈

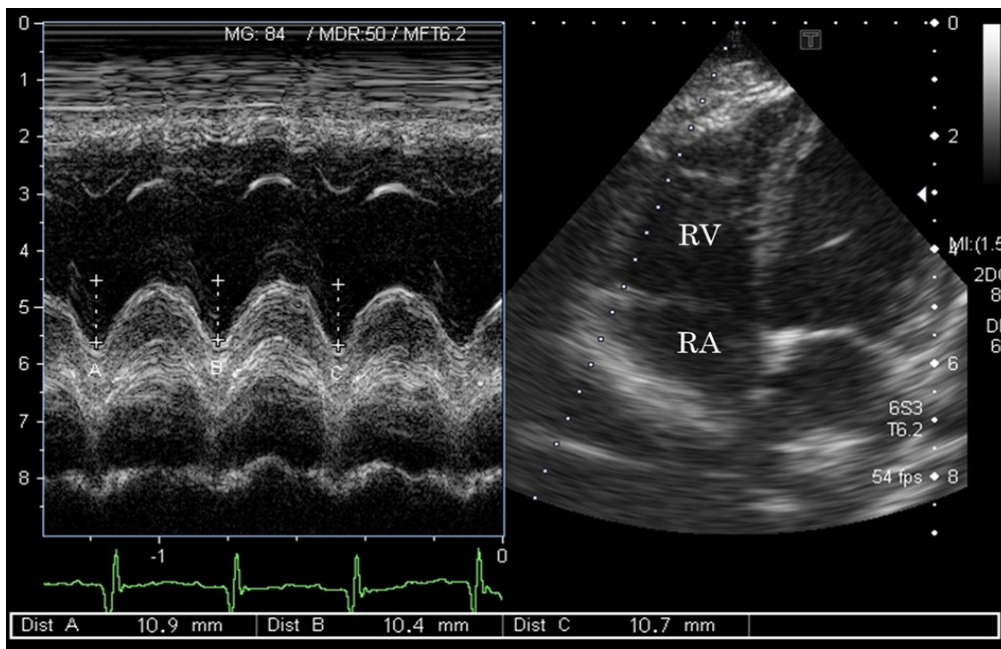


図2-2. 左側傍胸骨心尖部四腔像での三尖弁輪収縮期移動距離(TAPSE)の測定
 RV 右室; RA 右房

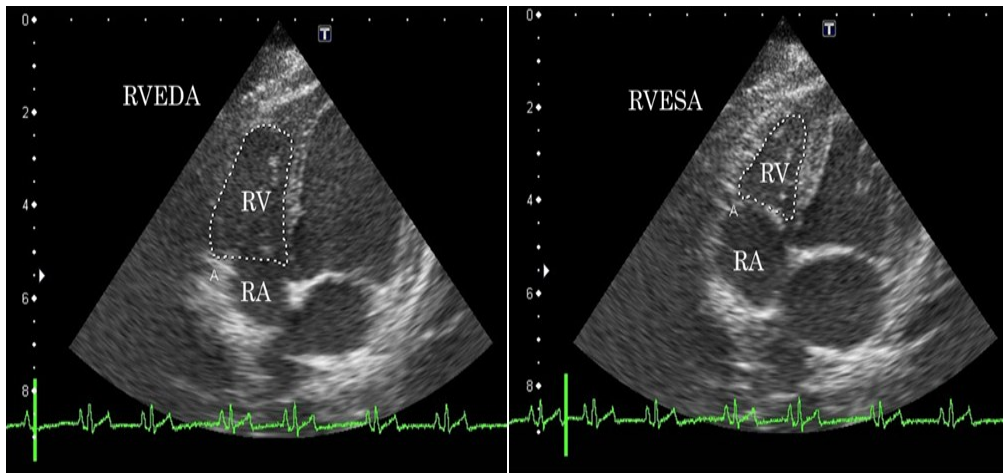


図 2-3. 左側傍胸骨心尖部四腔像での右室拡張末期面積(RVEDA)および右室収縮末期面積(RVESA)の測定

RV 右室; RA 右房

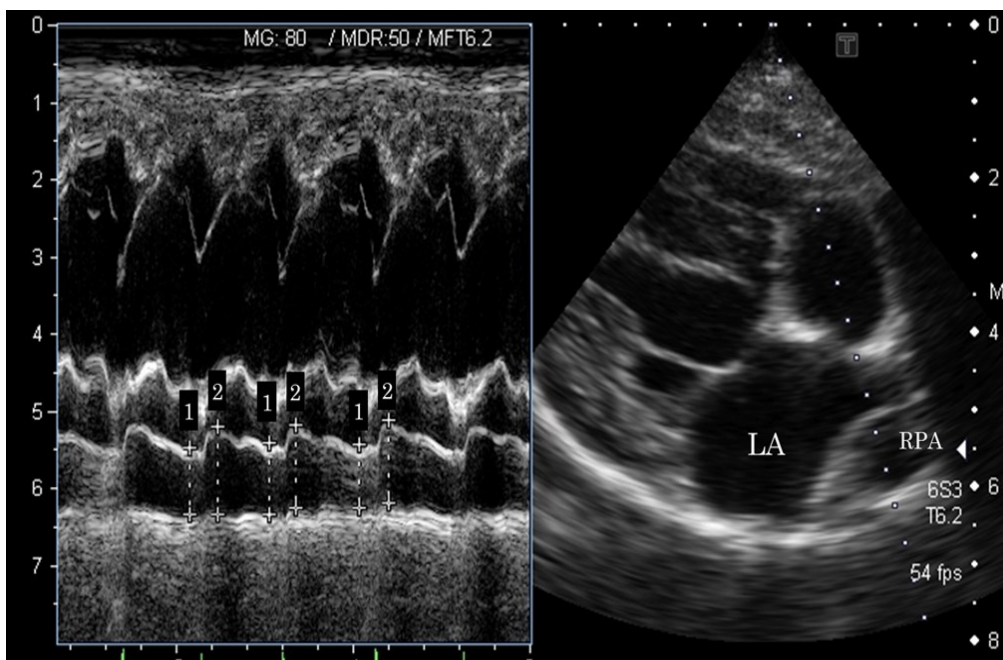


図 2-4. Mモード法を用いた右側傍胸骨長軸流入路像での右肺動脈の拡張期内径(RPAd;1)および収縮期内径(RPAs;2)の測定

LA 左房; RPA 右肺動脈

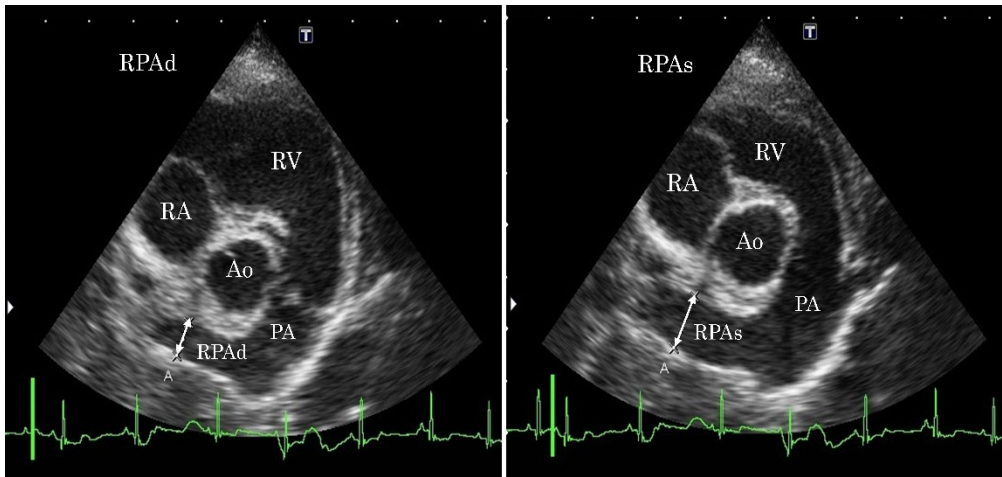


図 2-5. B モード法を用いた右側傍胸骨心基部短軸像での右肺動脈の拡張期内径 (RPA_d) および収縮期内径 (RPA_s) の測定

Ao 大動脈; RA 右房; RV 右室; PA 肺動脈; RPA 右肺動脈

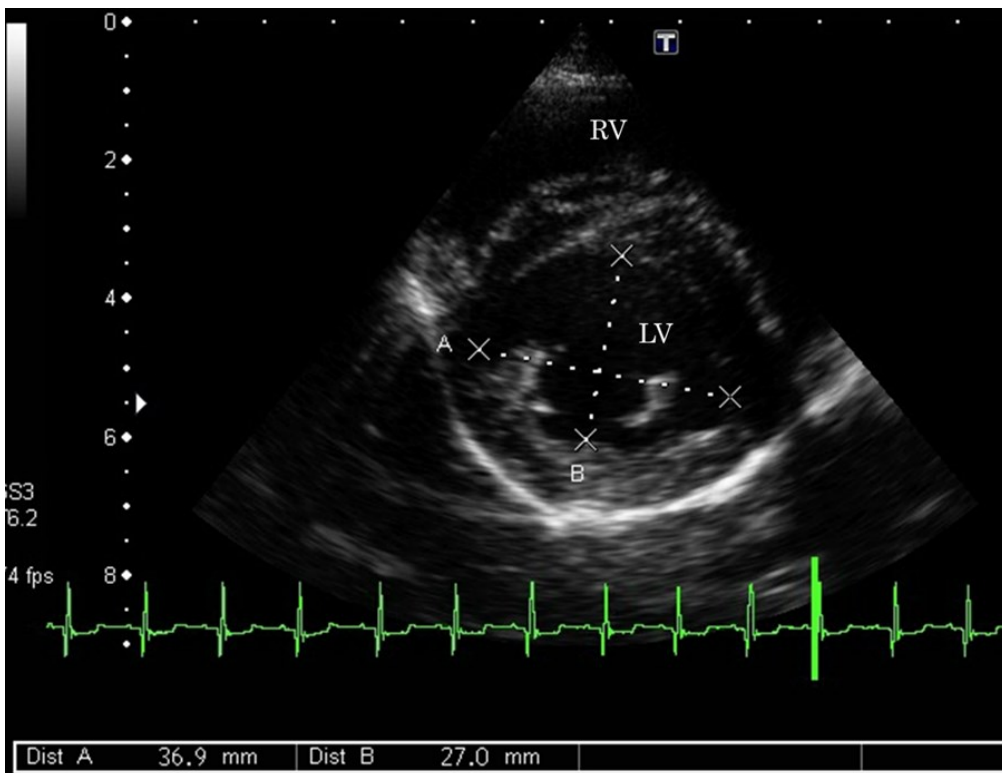


図 2-6. 右側傍胸骨短軸像腱索レベルでの偏心率 (EI) の測定 (A; 心室中隔に平行な左室内径、B; A に垂直な左室内径)

RV 右室; LV 左室

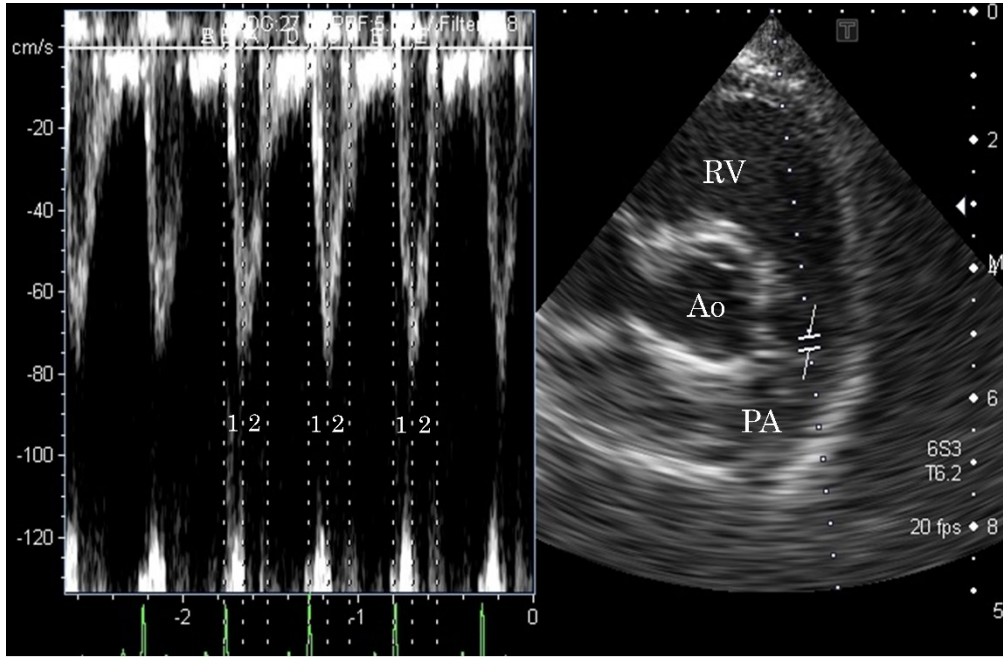


図 2-7. 肺動脈血流の加速時間/駆出時間比(AT/ET)の計測

1; 加速時間(AT)、1+2; 駆出時間(ET)

RV 右室; Ao 大動脈; PA; 肺動脈

統計解析

統計解析には市販のソフトウェア (SPSS Statistics 24.0、IBM) を用いた。Shapiro–Wilk 検定により正規性を評価した。モデル作製開始時 (BL) および CEPH 時の各パラメータの比較には、対応のある t 検定または Wilcoxon 符号付き順位検定を用いた。各 PAP (つまり sPAP、mPAP および dPAP)、そして心エコー図検査パラメータの関連性を評価するため、Pearson または Spearman 順位相関係数を用いた。そして、統計学的に有意だったパラメータをステップワイズ方式の重回帰分析へ投入し、各 PAP に独立して影響する因子を特定した。受信者操作特性 (ROC) 曲線により、CEPH を予測する上での各心エコー図検査パラメータの感度および特異度を算出し、適切なカットオフ値を求めた。P < 0.05 を統計学的に有意と判断した。

3. 結果

CEPH モデルの作製および各パラメータの変化

モデルの作製には 6–11 ヶ月 (21–35 回の注入) を要した。表 2-1 にモデル作製前後の各パラメータの変化を示す。CEPH モデルで、PA/Ao は有意に上昇し、AT/ET は有意に低下した。CEPH のイヌすべてで TR (中央値 3.1 m/s) が生じ、逆流速度が計測されたが、逆流は非常に少なく、三尖弁の弁尖から限局的に生じていた。そのため、TR の完全な連続波ドプラ波形を得ることはできなかった。同様に、PR (中央値 peak PR; 2.5 m/s, end PR; 1.3 m/s) も 5 頭中 4 頭で認めたものの、逆流が少量だったため、完全な連続波ドプラ波形を得ることはできなかった。

表 2-1. 慢性塞栓性肺高血圧症モデル作製前後での各パラメータの変化

	作製前	作製後
血行動態パラメータ		
HR (bpm)	116 (116–128)	120 (107–131)
sPAP (mmHg)	20.0 (15.7–22.9)	38.4 (33.2–45.8)*
mPAP (mmHg)	13.9 (12.2–16.4)	26.8 (22.0–31.9)*
dPAP (mmHg)	9.4 (7.9–13.4)	17.8 (13.8–24.9)*
2D 心エコー図検査パラメータ		
PA/Ao	0.90 (0.88–1.00)	1.01 (0.98–1.05)*
RVIDdn	3.72 (3.38–4.12)	4.46 (3.74–6.33)
TAPSEn	6.25 (5.25–6.92)	5.34 (4.90–5.80)
RVFAC (%)	41.9 (31.5–53.8)	36.4 (20.8–44.1)
RPAD _{B-mode} (%)	31.5 (19.0–33.3)	21.3 (18.5–31.5)
RPAD _{M-mode} (%)	33.1 (23.0–34.9)	23.0 (15.0–33.1)
EI 収縮期	1.09 (0.90–1.37)	1.14 (0.88–1.34)
EI 拡張期	1.14 (1.08–1.41)	1.25 (1.03–1.35)
ドプラ心エコー図検査パラメータ		
肺動脈血流速 (m/s)	0.96 (0.89–1.28)	0.91 (0.77–1.05)
AT/ET	0.48 (0.46–0.51)	0.41 (0.39–0.44)*
E 波 (m/s)	0.56 (0.42–0.83)	0.48 (0.40–0.74)
A 波 (m/s)	0.50 (0.28–0.61)	0.42 (0.25–0.59)
E/A	1.38 (0.86–1.78)	1.55 (0.82–1.69)
VTI (cm)	16.2 (12.7–18.6)	14.4 (13.4–18.0)
CO (mL/min)	2818 (1657–3891)	3042 (1831–3887)

(表 2-1 脚注)

数値は中央値(最小値-最大値)で示す

* P<0.05

HR 心拍数; sPAP 収縮期肺動脈圧; mPAP 平均肺動脈圧; dPAP 拡張期肺動脈圧;
PA/Ao 肺動脈/大動脈内径比; RVIDdn 標準化した拡張期右室内径; TAPSEn 標準化した三尖弁輪収縮期移動距離; RVFAC 右室分画面積変化率; RPAD, 右肺動脈伸展指数;
EI 偏心率; AT/ET 加速時間/駆出時間比; E 波 三尖弁拡張早期血流速; A 波 三尖弁拡張後期血流速; E/AE 波および A 波の比; VTI 速度時間積分値; CO 心拍出量

心エコー図検査パラメータおよび観血的な PAP 値の関連

sPAP は AT/ET ($r=-0.76$)、RVIDdn ($r=0.72$)、TAPSEn ($r=-0.72$) および PA/Ao ($r=0.71$) と有意に関連した(図 2-8)。また、mPAP は PA/Ao ($r = 0.79$)、AT/ET ($r = -0.69$)、TAPSEn ($r = -0.66$) および RVIDdn ($r = 0.65$) と有意に関連した(図 2-9)。加えて、dPAP が PA/Ao ($r = 0.79$) と有意に関連することが明らかとなった(図 2-10)。TRPG または PRPG と各 PAP 間に有意な関連は見られなかった。

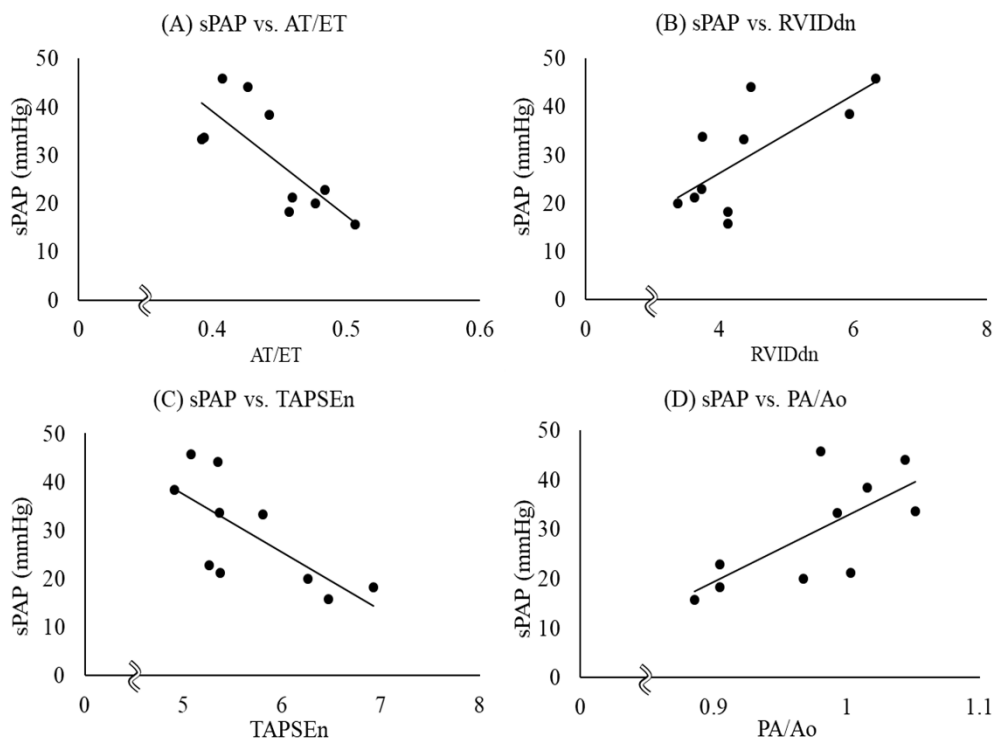


図 2-8. 収縮期肺動脈圧(sPAP)と相関した各心エコー図検査パラメータの散布図(A; 加速時間/駆出時間比[AT/ET] B; 標準化した拡張期右室内径 [RVIDdn] C; 標準化した三尖弁輪収縮期移動距離 [TAPSEn] D; 肺動脈/大動脈内径比 [PA/Ao])

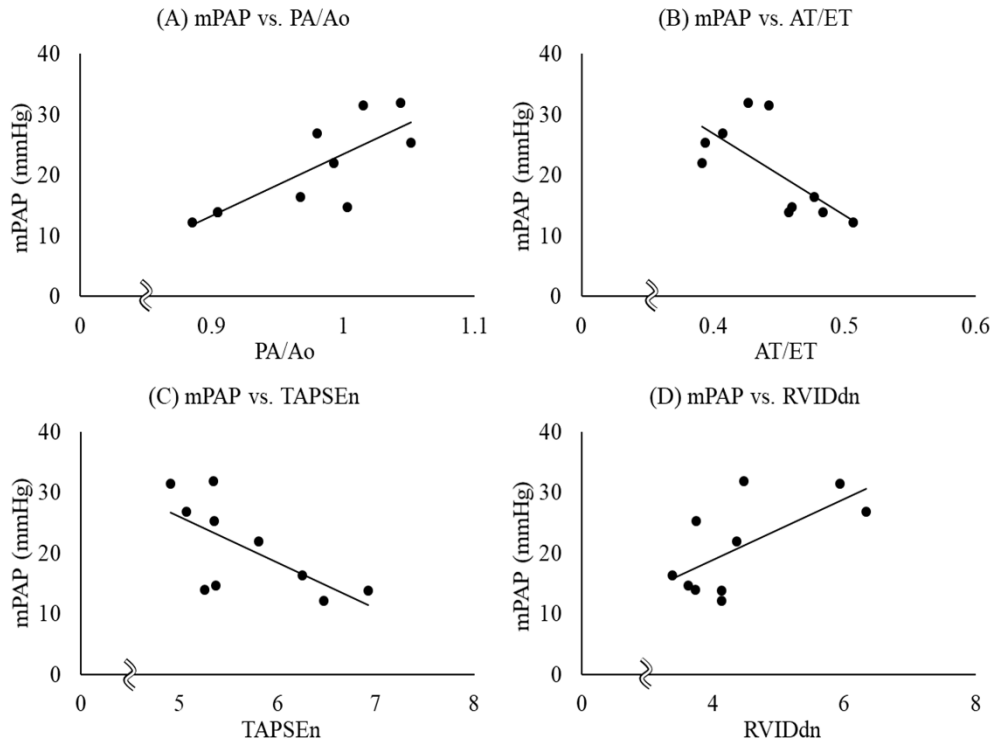


図 2-9. 平均肺動脈圧(mPAP)と 관련된 各心エコー図検査パラメータの 散布図(A; 肺動脈/大動脈内径比 [PA/Ao] B; 加速時間/駆出時間比 [AT/ET] C; 標準化した三尖弁輪収縮期移動距離 [TAPSEn] D; 標準化した拡張期右室内径 [RVIDdn])

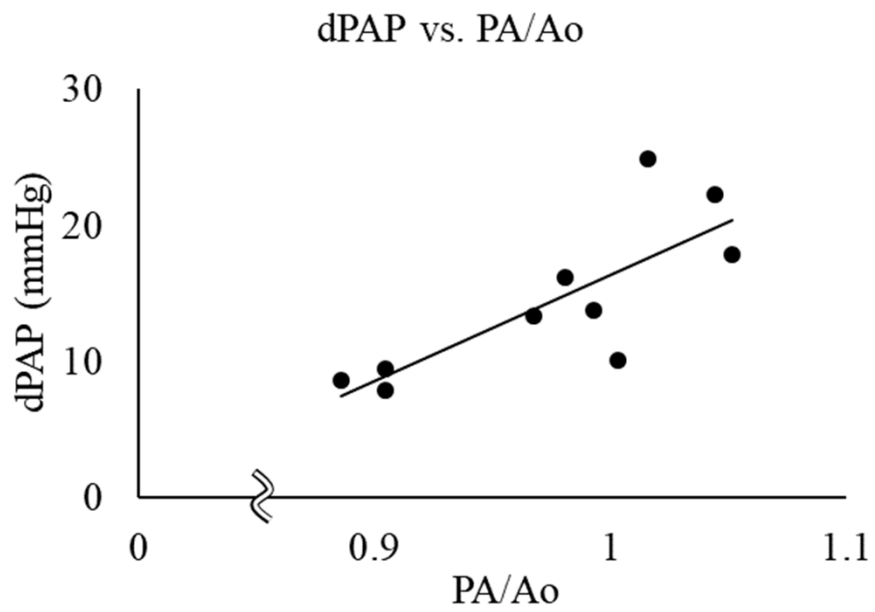


図 2-10. 拡張期肺動脈圧(dPAP)と関連した肺動脈/大動脈内径比(PA/Ao)の散布図

重回帰分析

重回帰分析により、AT/ET および RVIDdn が sPAP に影響する独立した因子であることが明らかとなった。加えて、PA/Ao および RVIDdn が mPAP に影響する独立した因子であることも判明した(表 2-2)。また、PA/Ao が dPAP に影響する唯一の因子として選択された。

表 2-2. 各肺動脈圧に対する重回帰分析の結果

従属変数	独立変数	偏相関係数	P 値
sPAP (mmHg)	AT/ET	-0.76	<0.05
	RVIDdn	0.71	<0.05
mPAP (mmHg)	PA/Ao	0.89	<0.01
	RVIDdn	0.82	<0.01
dPAP (mmHg)	PA/Ao	0.79	<0.01

sPAP 収縮期肺動脈圧; mPAP 平均肺動脈圧; dPAP 拡張期肺動脈圧; AT/ET 加速時間/駆出時間比; RVIDdn 標準化した拡張期右室内径; PA/Ao 肺動脈/大動脈内径比

ROC 曲線解析

PAPの上昇(sPAP>30mmHg および mPAP>20mmHg)を予測する心エコー図検査パラメータのカットオフ値を決定するために ROC 曲線解析を実施したところ、AT/ET(カットオフ値; 0.45)および PA/Ao(カットオフ値; 0.97)の2種類の指標が十分な予測精度を有することが明らかとなった。AT/ETの感度および特異度はいずれも100%で、PA/Aoの感度および特異度はそれぞれ100および80%だった(表2-3)。

表 2-3. 慢性塞栓性肺高血圧症の予測に対する ROC 解析結果

	カットオフ値	感度 (%)	特異度 (%)	AUC	P 値
AT/ET	0.45	100	100	1.00	<0.01
PA/Ao	0.97	100	80	0.92	<0.05

AT/ET 加速時間/駆出時間比; PA/Ao 肺動脈/大動脈内径比; AUC 曲線下面積

4. 考察

本章の結果から、イヌで PA/Ao の上昇または AT/ET の減少が確認された場合、PH を疑診すべきであると考えられた。PH は持続的な PAP の上昇を伴う複雑な疾患であり、多因子的な病態を介することで、最終的には肺血管収縮、肺動脈中膜の肥厚および内皮の肥厚、そして血栓といった病的変化に至る[45, 85]。PH を診断する最も正確な検査は RHC だが、費用および侵襲性が高いため、動物の臨床現場ではほとんど実施されない。そのため、イヌの PH は、心エコー図検査で TR または PR の測定が可能な場合にのみ、簡易ベルヌーイ式を用いて PAP を推定することで診断される[42, 68, 79]。しかし近年、TR や PR がなくとも、自然発生性 PH での PAP の上昇を示唆する心エコー図検査パラメータが検証されてきており、具体的には右室または肺動脈の拡大、肺動脈血流波形の変化、そして低下した右室収縮能などが挙げられる[64, 91, 96, 97]。

本章にて、RVIDdn は sPAP および mPAP と正相関を示し、重回帰分析でもこれら PAP に影響する独立した因子であった。この所見は過去の研究結果と一致しており、負荷により拡大した右室腔を反映すると思われる[4, 36, 41, 89]。したがって、このパラメータを日常的に測定することで、PAP の上昇を検出し、拡大した右室腔を定量的に評価することが可能かもしれない。

PA/Ao は各 PAP と有意な正の相関を示し、重回帰分析で mPAP および dPAP に影響する因子と識別された。以前の研究も PA/Ao が観血的な PAP 値と関連することを示しており、本章での所見と一致する[36]。また、PH に罹患した臨床例でも PA/Ao は増加しており、本パラメータの有用性を裏付けている[56, 89]。加えて、PA/Ao はカットオフ値を 0.97 に設定した際に、高い感度および特異度で PAP の上昇を予測できた。以上より、本パラメータは TR の有無にかかわらず、PAP の上昇を検出するスクリーニングツールとして有用であると思われる。

TAPSEn は sPAP および mPAP と強く相関した。重回帰分析では有意な因子として選択されなかったが、TAPSEn は PAP の上昇に伴い低下した。この所見に反し、自然発生性の粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) に続発する PH のイヌを組み込んだ以前の研究では、TAPSEn および TRPG 間に相関は認められなかった[66]。加えて、別の研究でも、TAPSEn は MMVD または PH を重症度別に分けたイヌの群間で有意に異ならなかった[10]。TAPSE

の特徴に関して、PH のヒトを対象とし、本パラメータに対する左室収縮能の影響を調査した研究では、TAPSE が右室収縮能の低下を反映するのみならず左室収縮能の影響を受け増減することが判明した[53]。つまり、MMVD に続発する PH のイヌでは、僧帽弁閉鎖不全による前負荷増加および後負荷減少のため左室収縮能が亢進しており、亢進した左室収縮能が右室収縮能をも増強したため、PH により右室収縮能が低下しているにもかかわらず TAPSE の変化が顕著に表れなかったのではないかとと思われる。しかし、前毛細血管性 PH の症例で TAPSE が有意に低下していたとする研究報告もある[56]。したがって、MMVD のような後毛細血管性の疾患ではなく、前毛細血管性の疾患に由来する PH では、経時的な TAPSEn の測定により PAP の上昇またはそれに付随する右室収縮能の低下を検出できるかもしれない。

以前の多くの研究で、AT/ET は PH 症例で有意に低下しており、PAP およびその推定値である TRPG と負の関連を示していた[36, 56, 78, 89]。これは本章の所見と一致している。加えて、本章で AT/ET は BL 時と比べ CEPH 時に有意に減少し、0.45 というカットオフ値を用いることで高い感度および特異度で PH を予測した。このカットオフ値は以前に報告された値とも類似しており、この値を用いることで、TR の有無にかかわらず PH を予測できると思われる[78]。

本章では、CEPH のイヌで TR および PR の測定が可能だったものの、それらから算出した各圧較差および観血的に測定した PAP 間に有意な関連はなかった。本章では 5 種類の心エコー図断面で TR および PR を探索したが、完全な波形を得ることはできなかった。この所見は、PH のイヌでは有意な TR または PR が必ずしも出現するわけではないことを裏付けており、TR が検出不可能だったことを報告したヒトの PH 患者での研究とも一致する[62]。さらに、急性 PH モデル犬を用いた研究によると、TRPG および PRPG では観血的な PAP を完全には推定できず、変動も無視できないものであった[84]。以上より、TR または PR のない動物であっても、上述の心エコー図検査パラメータに変化が見られた場合には PH を有する可能性が高いと思われる。また、逆流速による PAP の推定は、PH のイヌの症例ではあくまで包括的な検査の 1 項目と捉えるべきなのかもしれない。

本章にはいくつかの制限がある。第 1 に、実験に供したイヌの数が少ないことである。第 2 に、本章では CEPH を作製し、いくつかの心エコー図検査パラメータの有用性を報告したが、

これらが自然発生性、特に MMVD に続発した PH 罹患犬でも十分に PAP と関連するかは明らかでない。最後に、本実験では、麻酔後に十分な時間を設け、覚醒下のイヌで各種検査を実施したが、鎮静剤および麻酔薬が血行動態に影響した可能性を完全に否定することはできない。

5. 小括

本章では、慢性 PH モデルを用いて、PH 前後での右心系心エコー図検査パラメータおよび観血的な PAP の関連性を評価した。

結果として、RVIDdn、PA/Ao、AT/ET および TAPSEn が観血的に測定した PAP と有意に関連した。重回帰分析では AT/ET および RVIDdn が sPAP に独立して影響し、PA/Ao および RVIDdn が mPAP に独立して影響する因子であることが判明した。また、PA/Ao が dPAP に独立して影響する因子であることが判明した。そして、ROC 曲線解析により、AT/ET および PA/Ao が高い感度および特異度で CEPH を識別できることが判明した。また、本章で実験的に作製した CEPH モデル犬は、明らかな TR および/または PR を示さず、測定した各逆流血流速は観血的に測定した PAP と明らかな関連を示さなかった。このことから、臨床現場で遭遇する PH 罹患犬でも TR および/または PR が必ずしも生じるわけではない可能性が示され、上述の右心系心エコー図検査パラメータを駆使することで、TR や PR のないイヌでも PH の存在を予測し、PAP 上昇に関連した病態を評価できると思われる。

第3章

臨床的に健康なイヌに単回経口投与した

シルデナフィルの薬物動態

: 食事の影響および用量比例性の評価

1. 緒言

獣医学では、先天性心疾患、粘液腫様変性性僧帽弁疾患、呼吸器疾患および肺血栓塞栓症といった様々な疾患に由来する肺高血圧症(PH)へのシルデナフィル投与の有効性が多数報告されている[3, 7, 9, 47, 48, 92, 93]。しかし、イヌでのシルデナフィルの薬物動態に関する報告は限られており、投与量および投薬頻度を決定する上での基本的な情報が乏しいのが現状である。ヒトでは、シルデナフィルは食事の影響を受けることが判明しており、食事と共に服薬することで血漿中濃度および吸収量が低下する[60]。そのため、シルデナフィルを食事の1から2時間前に摂取する方が高い効果を期待できる。またヒトでは、シルデナフィルの血漿中濃度および吸収量が、軽度ではあるものの用量非比例性に増加することが知られている[60]。獣医臨床現場では、PHをはじめとした種々の心疾患を有するイヌに対し食事と共に治療薬を投与することは非常に一般的であり、ヒトのように食事がシルデナフィルの薬物動態に影響するとしたら、投薬時間を変更したほうがより高い効果を期待できるかもしれない。加えて、PHのイヌでのシルデナフィルの有用性を報告した上記の研究では、幅広い用量でシルデナフィルを用いている[60]。ヒトと同様、イヌに投与したシルデナフィルに用量非比例性がある場合、投与量や投薬頻度を調整する必要性が生じる可能性があるにもかかわらず、イヌでのシルデナフィルの用量比例性は一切評価されていない。

したがって本章では、イヌに経口投与したシルデナフィルの基本的な薬物動態特性を調査することに加え、食事の影響および用量比例性を評価することを目的とした。

2. 材料および方法

本学獣医内科学研究室第二で管理している臨床的に健康な雌のビーグル犬を用いて後述する2種類の実験を実施した。イヌは1頭ずつ個別にケージで飼育され、市販のドライフードを給与して管理した。薬剤投与後の各採血時点で、低血圧徴候(元気消失および大腿動脈圧減弱)、嘔吐、下痢および神経症状といった有害反応の有無を監視した。血圧はオシロメトリック法を用いて非観血的に測定した。本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て本実験を行った(承認番号 28S-55)。

実験 1: 食事の影響

本実験はクロスオーバー法を用いて実施し、絶食下またはフード給与中のビーグル犬 6 頭(2-9 歳、8-10kg)にシルデナフィル(Viagra[®], Pfizer, USA)を 1 mg/kg 経口投与した。ウォッシュアウト期間には少なくとも 1 週間を設けた。絶食下のイヌには投薬して 4 時間後に市販のドライフードを与えた。

実験 2: 用量比例性の評価

本実験はクロスオーバー法を用いて実施し、絶食下のビーグル犬 5 頭(2-8 歳、8-10kg)にシルデナフィルを 1、2 または 4 mg/kg 経口投与した。ウォッシュアウト期間には少なくとも 1 週間を設けた。投薬して 4 時間後に市販のドライフードを与えた。

血液採取および保存

事前に橈側皮静脈に設置したカテーテルから 5 mL の血液を採取し、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)加採血管に分注した。採血は投薬前に加え、投与して 10、20、30、45 分、1、1.5、2、2.5、3、4、8、12 および 16 時間後に実施した。採血後、直ちに遠心分離(4 °C、1000 ×g、10 分)をして血漿を得た。測定まで血漿を-80 °Cで冷凍保存した。血漿中シルデナフィル濃度測定は、血漿取得後 1 週間以内に実施した。

血漿中シルデナフィル濃度測定

血漿中シルデナフィル濃度は、以前の研究をもとに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により測定した[29, 82]。分析用のシルデナフィルおよびブチルパラベン(いずれも和光純薬工業)を、それぞれ標準品および内部標準物質として用いた。血漿検体の前処理として、まずマイクロチューブ内の 500 μL の血漿に 2 μg/mL のブチルパラベン 50 μL および 5 mol/L の水酸化ナトリウム 200 μL を加え 30 秒間攪拌した。攪拌した溶液をマイクロチューブからガラス製試験管に移し、3 mL の酢酸エチルを加え、3 分間攪拌した。そして試験管を遠心分離(5 °C、1000 ×g、10 分)し、上澄み液を別のガラス製試験管に分注した。上澄み液を窒素噴霧下で乾固し、アセトニトリルおよび 30 mmol/L のリン酸二水素カリウム緩衝液を 47: 53 で混合して作製した移動相 140 μL で乾固物を溶解した。溶液をマイクロチューブに入れ遠心分離(4 °C、21880 ×g、10 分)し、上澄み液 80 μL を C18 Inertsil ODS2 HPLC カラム(150

×4.6 mm; 5 μm 粒子径; GL Science)に注入した。流量速度は 1 mL/min とし、測定環境は 25 °Cに設定した。検出波長は 230 nm に設定した。

血漿中シルデナフィル濃度は、5、50、500 および 5000 ng/mL の標準溶液で作製した検量線を用いて定量した。定量限界は、検量線の下限である 5 ng/mL とした。検量線は、決定係数(R²)が 0.999 を上回り、なおかつ検量線から算出した濃度が各標準溶液の濃度の 15% 以内に逆算できた場合に採用した。また、日内および日間変動は、5、50 および 500 ng/mL に調整したシルデナフィル標準溶液を用いて評価した。日内変動は、各濃度を 5 つずつ測定して評価し、日間変動は連続しない 4 日間で評価した。その結果、日内変動の真度および精度はそれぞれ 100–107 %および 2.4–5.6 %だった。そして、日間変動の真度および精度はそれぞれ 92–115 %および 8.6–9.2 %だった。

薬物動態解析

本章では、過去の研究にもとづき、モーメント解析を用いて以下の薬物動態パラメータを算出した[60, 101]。算出には Excel 2016 (Microsoft, USA)を用いた。血漿中濃度の最大値(C_{max})に達する時間(T_{max})は各イヌの濃度–時間曲線を描く際に使用した実測値から抽出した。最終測定時点までの濃度–時間曲線下面積(AUC_{fin})は台形法を用いて算出した。消失速度定数(k_{el})は、濃度–時間曲線の消失相を対数変換して得られた直線の傾きから算出した。この際、最終測定時点から連続した3点以上の濃度データを用いた。無限時間まで外挿した濃度–時間曲線下面積(AUC_{inf})は AUC_{fin} および k_{el}を用いて算出した。同様に、縦軸に血漿中濃度と時間の積である一次モーメント、横軸に時間を取ったモーメント曲線に関して、最終測定時点までのモーメント曲線下面積(AUMC_{fin})を用いて、無限時間まで外挿したモーメント曲線下面積(AUMC_{inf})を算出した。平均滞留時間(MRT)は AUMC_{inf}/AUC_{inf}から算出した。消失半減期(t_{1/2})は log₁₀ 2/ k_{el}から算出した。そして見かけのクリアランス(CL/F)および分布容積(V/F)を以下の式より求めた: CL/F = Dose/AUC_{inf} および V/F = (CL/F)/k_{el}。実験1では、シルデナフィルの相対的バイオアベイラビリティをフード給与時 AUC_{inf}/絶食下 AUC_{inf}より算出した。

統計解析

統計解析は市販のソフトウェア (SPSS Statistics 24.0、IBM) を用いて実施し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。断らない限り、数値は中央値(最小-最大)で示した。実験 1 の絶食下およびフード給与時に得られた各薬物動態パラメータの比較にはウィルコクソン符号付き検定を用いた。実験 2 では、 C_{max} および AUC_{inf} の用量比例性を評価するため、最も検出精度が高いと報告されているパワーモデル解析を用いた。パワーモデル解析では、 C_{max} および AUC_{inf} を以下の式に当てはめて解析を行った： $Y = \alpha * Dose^\beta$ 。この曲線式は対数変換を行うことで $\log(Y) = \log(\alpha) + \beta * \log(Dose)$ の直線式に書き換えることができ、 Y には C_{max} または AUC_{inf} が、そして $Dose$ には用量(本実験では 1、2 または 4)が入る。ここで、 β は直線の傾きを示し、算出した β の 90%信頼区間が 1 を含み、なおかつ分散分析にもとづく不適合性の検定が有意でなかった場合 ($P > 0.05$) に用量比例性があると判断した[30, 39]。 T_{max} 、 MRT および $t_{1/2}$ に関して、各用量間での差を検出するために Friedman 検定を用いた。

3. 結果

全実験を通じて、深刻な有害反応は認められなかったが、2 mg/kg のシルデナフィルを投与した 1 頭のイヌが 24 時間後に一過性の軽度な下痢を示した。

実験 1: 食事の影響

縦軸に血漿中シルデナフィル濃度を、そして横軸に時間を設けた濃度-時間曲線を図 3-1 に示す。図 3-1 において、フード給与時には、絶食時ほどの血漿中濃度の上昇が認められなかった。また、表 3-1 に各薬物動態パラメータを記す。本実験では、絶食下とフード給与時の C_{max} 、 AUC_{inf} 、 CL/F および V/F に有意差を認めた。また、有意差こそなかったが、6 頭中 5 頭でフード給与時に T_{max} が延長していた。 $t_{1/2}$ および MRT は絶食下とフード給与時に有意に変化しなかった。

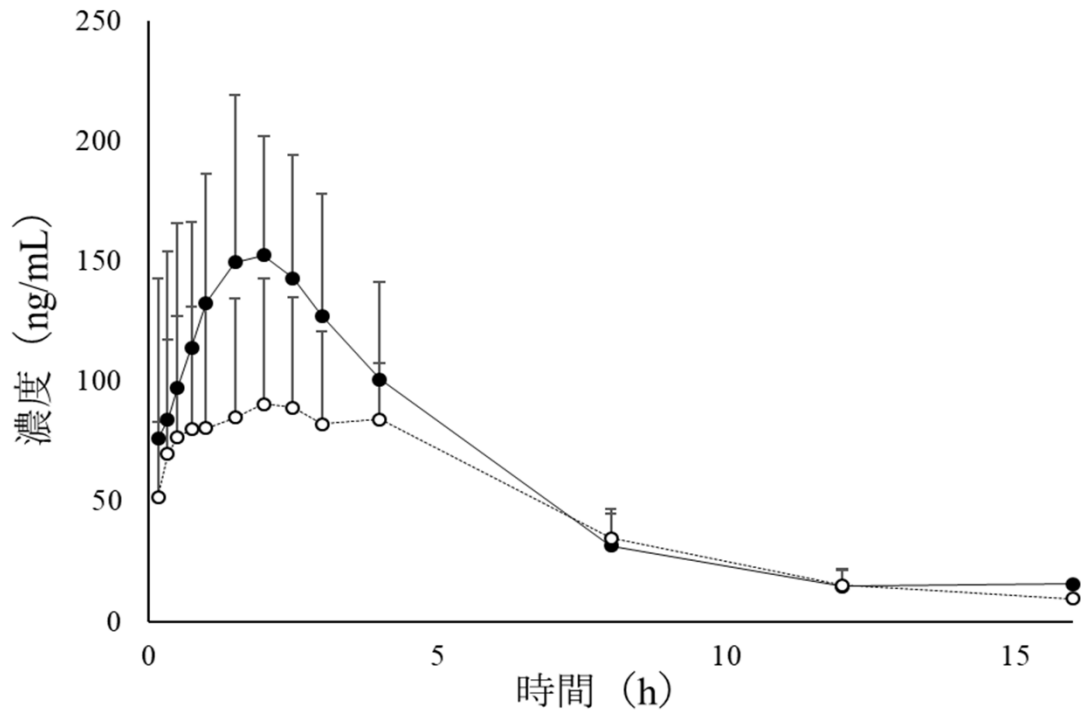


図 3-1. 絶食時(●)およびフード給与時(○)にシルデナフィルを 1 mg/kg で経口投与した後の血漿中濃度-時間曲線(平均および標準偏差)

表 3-1. 絶食時およびフード給与時にシルデナフィルを 1 mg/kg で経口投与した後の薬物動態

薬物動態パラメータ	絶食時	フード給与時
C_{max} (ng/mL)	205.4 (161.7–226.9)	103.0 (73.9–163.8) *
T_{max} (h)	1.3 (0.3–2.5)	2.3 (0.5–4.0)
AUC_{inf} (ng·h/mL)	884.2 (615.0–1182.2)	665.1 (534.6–1105.5) *
MRT (h)	4.1 (3.3–6.0)	6.0 (3.5–6.6)
$t_{1/2}$ (h)	2.8 (2.3–3.4)	3.1 (2.1–4.3)
CL/F (L/h/kg)	1.1 (0.8–1.6)	1.5 (0.9–1.9) *
V/F (L/kg)	4.4 (3.5–5.6)	5.8 (4.6–8.9) *
相対的バイオアベイラビリティ (%)		87.1 (60.0–93.5)

数値は中央値(最小値–最大値)で示す

* $P < 0.05$

C_{max} 最高血漿中濃度; T_{max} 最高血漿中濃度到達時間; AUC_{inf} 無限時間まで外挿した濃度–時間曲線下面積; MRT 平均滞留時間; $t_{1/2}$ 消失半減期; CL/F 経口クリアランス; V/F 見かけの分布容積

実験 2: 用量比例性の評価

縦軸に血漿中シルデナフィル濃度を、そして横軸に時間を設けた濃度-時間曲線を図 3-2 に示す。図 3-2 では、投与量が増えるほどに血漿中濃度の上昇が認められた。また、表 3-2 に各薬物動態パラメータを記す。パワーモデル解析から、1-4 mg/kg の用量で C_{max} および AUC_{inf} が用量非比例性に増加することが判明した。 C_{max} の点推定値は 1.33 で、90%信頼区間は 1.17-1.49 だった。 AUC_{inf} の点推定値は 1.23 で、90%信頼区間は 1.07-1.39 だった。各用量間で T_{max} 、MRT および $t_{1/2}$ に有意な差はなかった。

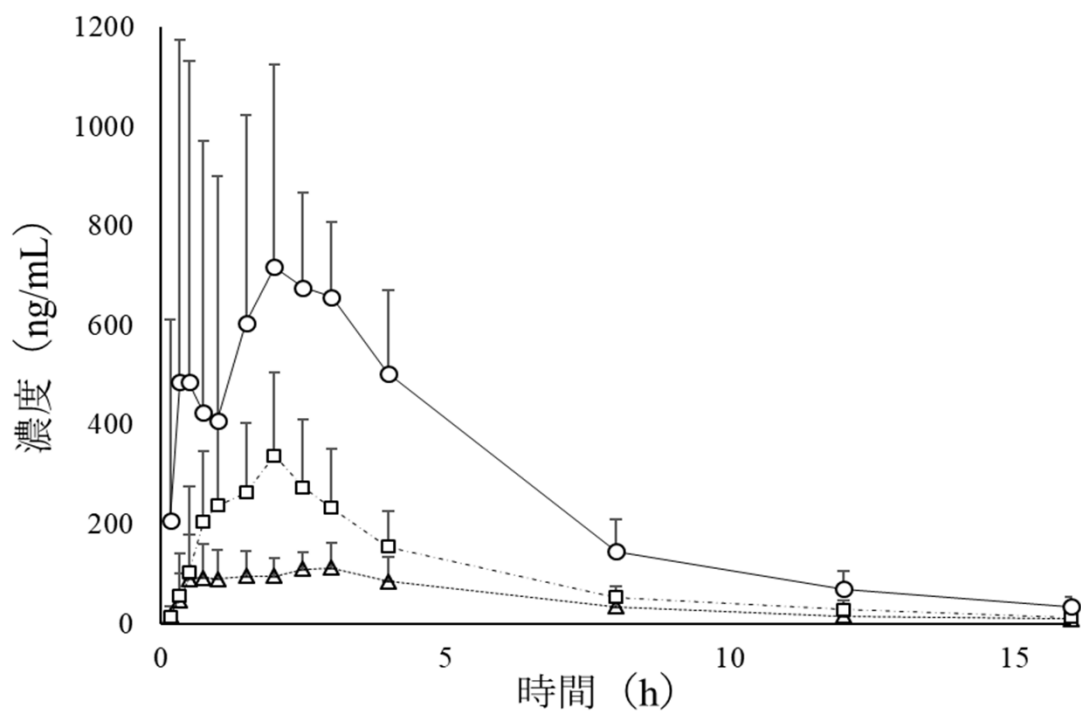


図 3-2. 絶食時にシルデナフィルを 1(△)、2(□)または 4(○) mg/kg で経口投与した後の血漿中濃度-時間曲線(平均および標準偏差)

表 3-2. 絶食時にシルデナフィルを 1、2 または 4 mg/kg で経口投与した後の薬物動態

薬物動態 パラメータ	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
C_{\max} (ng/mL)	170.5 (150.9–214.8)	420.5 (218.6–583.2)	1053.4 (830.1–1513.1)
T_{\max} (h)	1.5 (0.5–3.0)	1 (0.5–2.0)	2 (0.3–3.0)
AUC_{inf} (ng·h/mL)	705.4 (603.7–1028.1)	1355.9 (1158.7–2291.1)	4413.2 (3087.4–5136.6)
MRT (h)	5.0 (4.3–6.7)	4.2 (3.6–6.2)	4.4 (4.0–6.2)
$t_{1/2}$ (h)	3.2 (3.1–3.6)	2.9 (2.3–4.1)	2.9 (2.2–4.1)
CL/F (L/h/kg)	1.4 (1.0–1.7)	1.5 (0.9–1.7)	0.9 (0.8–1.3)
V/F (L/kg)	6.2 (4.4–7.6)	5.4 (3.6–10.3)	3.8 (3.3–4.6)

数値は中央値(最小値–最大値)で示す

C_{\max} 最高血漿中濃度; T_{\max} 最高血漿中濃度到達時間; AUC_{inf} 無限時間まで外挿した濃度–時間曲線下面積; MRT 平均滞留時間; $t_{1/2}$ 消失半減期; CL/F 経口クリアランス; V/F 見かけの分布容積

4. 考察

本章の 2 種類の実験により、健康なイヌでのシルデナフィルに対する食事の影響および用量比例性の有無が明らかとなった。一過性かつ軽度な下痢を呈したイヌが 1 頭いたものの、シルデナフィル投与による他の深刻な有害反応は現れなかった。ヒトでは、シルデナフィルの最も一般的な副作用は、頭痛、鼻づまりおよび悪心であり、これらは毛細血管平滑筋に作用することで生じる血管拡張により生じると言われている[11]。本実験では頭痛などの全ての有害反応を評価できたわけでないが、痛みによるものと思われる活動性の低下を示した個体はいなかった。臨床例での使用を考慮すると、本実験で確認したシルデナフィルの安全性を裏付けるため、単回でなく複数回の投与による安全性の試験が必要と思われる。加えて、長期投与に付随して生じ得る有害反応を調査するためのさらなる研究が必要である。

実験 1 で、食事によりシルデナフィルの C_{max} および AUC_{inf} がそれぞれ絶食時からおよそ 40 および 20%減少することが判明した。この所見はヒトでシルデナフィルに対する食事の影響を調査した研究結果と一致する[60]。本実験では、絶食時と比べ、フード給与時に CL/F および V/F が増加したが、これはフード給与時の相対的バイオアベイラビリティの低下によるものと考えられる。また、本実験結果と直接比較はできないものの、以前の研究で報告されたシルデナフィルの絶対的バイオアベイラビリティ(50%)を踏まえると、絶食下およびフード給与時のいずれでも、シルデナフィルは速やかに全身に分布すると予想される[101]。シルデナフィルは高価な薬剤であり、PH の症例では投薬が生涯にわたることが多い。したがって、本実験での結果を踏まえると、食事の 1-2 時間前に投薬したほうがシルデナフィルの吸収に影響せず、より高い効果を期待できると思われる。

実験 2 では、パワーモデル解析によりシルデナフィルの用量非比例性が明らかとなった。以前の研究によると、本実験で得られた用量非比例性の程度は軽度と思われ、用量非比例性を示したヒトでの研究と一致する[40, 60]。イヌに経口投与したシルデナフィルは主に肝臓のミクロソームアイソザイムにより代謝されることから、この用量非比例性は肝臓でのシルデナフィルの代謝飽和を示唆する[52, 101]。また、3 種類の用量間で $t_{1/2}$ に差がなかったが、これは用量非比例性が軽度だったためと思われる。本実験結果は、シルデナフィルを実際に投与される PH のイヌでの薬物動態の変化を検出する上で役に立つ。PH では心拍出量の低下や全身静脈のうっ血に起因する薬物動態の変化が生じる可能性があるため、PH のイヌ

でのシルデナフィルの薬物動態に関する研究が望まれる。

本実験で得たシルデナフィルの $t_{1/2}$ はおよそ 3 時間であり、これは以前の研究結果と概ね一致している[2]。この値を踏まえると、イヌに経口投与したシルデナフィルは、投与頻度に関係なく、 $t_{1/2}$ の 5 から 6 倍、つまり 15 から 18 時間で定常状態に達すると予想される。つまり、投薬頻度を増やすほど、定常状態の最小および最大濃度を高く維持することができ、より高い効果を得られるかもしれない。しかし、濃度を高めるほど有害反応が発現する可能性も高めると考えられるため、薬力学試験を実施し、イヌでの適切な投与量を決定する必要がある。

本実験にはいくつかの制限がある。第 1 に、シルデナフィルの注射用製剤を用いた静脈内投与時の薬物動態試験を実施できなかったことが挙げられる。これにより絶対的バイオアベイラビリティを算出することができず、クリアランスおよび分布容積が CL/F および V/F となってしまう、シルデナフィルの排泄および分布に関するより詳細な検討ができなかった。第 2 に、実験に供したイヌがすべてメスだったことである。これによりイヌのシルデナフィルの薬物動態に関して性差を評価することができなかった。したがって、同数のオスおよびメスを用いた薬物動態試験を実施し、性差を検討する必要があると思われる。最後に、低血圧の有無を判定するにあたり、観血的血圧測定法ではなく、非観血的なオシロメトリック法を用いたことが挙げられる。これによりシルデナフィルの血管拡張作用に由来する有害反応を見逃し、正確に評価できなかった可能性がある。

5. 小括

本章では、健康なイヌでのシルデナフィルの薬物動態評価に加え、食事の影響および用量比例性を評価した。

結果として、血漿中シルデナフィル濃度は投与後 1–2 時間で最高値に達することが判明した。また、フードの給与により C_{max} および AUC_{inf} が絶食時に比べそれぞれ 40 および 20% 低下したことから、臨床現場でも投薬とフードの給与を分けて行うことで、シルデナフィルの吸収低下を抑えることができ、より高い血漿中濃度を達成できると思われる。絶食時とフード給与時で $t_{1/2}$ に差はなく、いずれも 3 時間だったため、投薬頻度にかかわらず 15–18 時間で定常状態に達することがわかった。そして、シルデナフィルの C_{max} および AUC_{inf} は 1、2

および 4 mg/kg の範囲で用量非比例性に増加することが判明したが、非比例性の増加程度が軽度だったことから臨床的な重要性は低いと判断した。

第4章

慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬に
単回経口投与したシルデナフィルの
薬物動態

1. 緒言

ヒト医学では、心不全による薬物動態特性の変化が報告されており、投与量の調整および投薬頻度を決定する際に有益な情報となる。心不全時に生じ得る薬物動態の変化には、消化管血流量の低下および胃内容物排泄速度の低下による薬剤吸収の減少に加え、腎臓および肝臓といった薬剤排泄に関わる臓器への血流減少による薬剤排泄量の低下が挙げられる[61]。

獣医学では、肺高血圧症(PH)は原発性に加え、先天性心疾患、粘液腫様変性性僧帽弁疾患(MMVD)、呼吸器疾患および肺血栓塞栓症といった様々な疾患に続発する複雑な疾患であり、特にイヌではMMVDに続発することが最も多い[12, 27, 28, 34, 43, 55, 63, 76]。PHでは右心系への負荷による心拍出量低下に伴い全身臓器への血流低下が生じ、薬物動態の変化が生じる可能性がある。

シルデナフィルはイヌのPHの治療に頻用される薬剤の1つだが、この薬剤の薬物動態をPHのイヌで報告した研究はなく、本薬剤の薬物動態に対するPHの影響の有無は不明である。加えて、シルデナフィルの有用性を報告した以前の研究では幅広い用量(約1-4 mg/kg)のシルデナフィルを用いていたにもかかわらず、PHのイヌでの用量比例性は一切評価されていない[3, 7, 47, 48, 57, 59, 92, 93]。そのうえ、シルデナフィルのイヌでの薬物動態はマウスおよびラットのそれと著しく異なるため、これらの動物を用いた研究結果を外挿することは困難である[1, 102]。

したがって、本章では実験的に作製した慢性PHモデル犬でのシルデナフィルの薬物動態を調査することを目的とした。

2. 材料および方法

本学獣医内科学研究室第二で管理している臨床的に健康な雌のビーグル犬4頭(3-8歳、8.4-11.3 kg)を用いた。イヌは1頭ずつ個別にケージで飼育され、市販のドライフードを給与して管理した。本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て本実験を行った(承認番号29S-24)。

右心カテーテル検査(RHC)および慢性塞栓性肺高血圧症(CEPH)モデル作製

第2章と同様、プロポフォール(6 mg/kg, IV)を用いて導入したイヌに挿管を行い、同剤の持続点滴(0.1–0.2 mg/kg, IV)で麻酔を維持した[8, 86]。横臥位にした麻酔下のイヌの頸静脈に4または5 Frのシース(Catheter Introducer, Medikit, Japan)を経皮的に設置し、4 Frのカテーテル(Wedge Pressure Catheter, Harnac Medical Products, USA)または5 Frのカテーテル(Swan-Ganz Catheter, Edwards Lifesciences, USA)を挿入した。較正済みの圧トランスデューサにカテーテルを接続し血圧を測定しつつ、右房および右室を経て肺動脈へと進めた。肺動脈まで達した後、プロポフォールの注入を止め、イヌを覚醒させた。その後60–90分間安置し、自力歩行を確認した後、横臥位にて血行動態パラメータを測定した。モデル作製途中の計測は収縮期、平均および拡張期肺動脈圧(それぞれsPAP、mPAPおよびdPAP)のみとした。本章では、第2章と異なり、モデル作製前後に上述のPAPに加え右房圧(RAP)、肺動脈楔入圧(PAWP)および心拍出量(CO)を測定した。COは5Frのカテーテルを用いて熱希釈法により測定した。RHCと同時に、オシロメトリック法の血圧計(PetMap, Ramsey Medical, USA)を用いて収縮期、平均および拡張期の全身動脈圧(それぞれsSAP、mSAPおよびdSAP)を測定した。また、肺および全身血管抵抗(それぞれPVRおよびSVR)を以下の式より算出した; 1) $PVR [Wood\ units] = (mPAP [mmHg] - PAWP [mmHg]) / CO (L/min)$ 、2) $SVR [Wood\ units] = (mSAP [mmHg] - RAP [mmHg]) / CO (L/min)$ 。

CEPHモデルは過去の報告にもとづき、カテーテルから直径100–300 μmのマイクロスフェア(Sephadex, GE Healthcare, USA)を間欠的に注入することで作製した[36, 73]。注入後のsPAPが40–50 mmHgになるようマイクロスフェアの注入量を調整した。以前の報告と同様、数日でPAPの低下が見られたため、上記の処置を約1週間に1回の頻度で実施し、sPAPおよびmPAPがそれぞれ30および20 mmHgを超えるまで徐々にPAPを上昇させた[73]。本章では、第2章よりも肺高血圧の状態が維持されたモデルを作製するため、1ヵ月間マイクロスフェアを注入しなくてもなおsPAPおよびmPAPがそれぞれ30および20 mmHgを超えていた場合にモデル作製完了とし、薬物動態試験を実施した。

薬物動態試験

第3章と同様、本試験はクロスオーバー法を用いて実施し、絶食下のモデル犬4頭にシルデナフィル(Viagra[®], Pfizer, USA)を1, 2または4 mg/kgで経口投与した。ウォッシュアウト

期間には少なくとも1週間を設けた。投薬して4時間後に市販のドライフードを与えた。採血時に、低血圧徴候、嘔吐、下痢および神経症状の有無を確認した。血圧はオシロメトリック法を用いて非観血的に測定した。

血液採取および保存

事前に撓側皮静脈に設置したカテーテルから5 mLの血液を採取し、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)加の採血管に分注した。採血は、投薬前に加え、投与して10、20、30、45分、1、1.5、2、2.5、3、4、および12時間後に実施した。採血後、直ちに遠心分離(4°C、1000×g、10分)をして血漿を得た。測定まで血漿を-80°Cで冷凍保存した。血漿中シルデナフィル濃度測定は、血漿取得後1週間以内に実施した。

血漿中シルデナフィル濃度測定

血漿中シルデナフィル濃度は、第3章での実験と同様、以前の研究をもとに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により測定した[29, 82]。分析用のシルデナフィルおよびブチルパラベン(いずれも和光純薬工業)を、それぞれ標準品および内部標準物質として用いた。血漿検体の前処理として、まずマイクロチューブ内の500 μLの血漿に2 μg/mLのブチルパラベン50 μLおよび5 mol/Lの水酸化ナトリウム200 μLを加え30秒間攪拌した。攪拌した溶液をマイクロチューブからガラス製試験管に移し、3 mLの酢酸エチルを加え、3分間攪拌した。そして試験管を遠心分離(5°C、1000×g、10分)し、上澄み液を別のガラス製試験管分離した。上澄み液を窒素噴霧下で乾固し、アセトニトリルおよび30 mmol/Lのリン酸二水素カリウム緩衝液を47:53で混合して作製した移動相140 μLで乾固物を溶解した。溶液をマイクロチューブに入れ遠心分離(4°C、21880×g、10分)し、上澄み液80 μLをC18 Inertsil ODS2 HPLC カラム(150×4.6 mm; 5 μm 粒子径; ジーエルサイエンス)に注入した。流量速度は1 mL/minとし、測定環境は25°Cに設定した。検出波長は230 nmに設定した。

薬物動態解析

第3章と同様、モーメント解析を用いて以下の薬物動態パラメータを算出した[60, 101]。算出にはExcel 2016 (Microsoft, USA)を用いた。血漿中濃度の最大値(C_{max})に達する時間

(T_{max})は各イヌの濃度-時間曲線を描く際に使用した実測値から抽出した。最終測定時点までの濃度-時間曲線下面積(AUC_{0-t})は台形法を用いて算出した。消失速度定数(k_{el})は、濃度-時間曲線の消失相を対数変換して得られた直線の傾きから算出した。この際、最終測定時点から連続した3点以上の濃度データを用いた。無限時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積($AUC_{0-\infty}$)は AUC_{0-t} および k_{el} を用いて算出した。同様に、縦軸に血漿中濃度と時間の積である一次モーメント、横軸に時間を取ったモーメント曲線に関して、最終測定時点までのモーメント曲線下面積($AUMC_{0-t}$)を用いて、無限時間まで外挿したモーメント曲線下面積($AUMC_{0-\infty}$)を算出した。平均滞在時間(MRT)は $AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}$ から算出した。消失半減期($t_{1/2}$)は $\log_{10} 2 / k_{el}$ から算出した。そして見かけのクリアランス(CL/F)および分布容積(V/F)を以下の式より求めた; $CL/F = Dose / AUC_{0-\infty}$ および $V/F = (CL/F) / k_{el}$ 。

統計解析

統計解析は市販のソフトウェア(SPSS Statistics 24.0、IBM)を用いて実施し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。第3章と同様、 C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ の用量比例性を評価するため、最も検出精度が高いとされているパワーモデル解析を用いた。パワーモデル解析では、 C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ を以下の式に当てはめて解析を行った; $Y = \alpha * Dose^\beta$ 。この曲線式は対数変換を行うことで $\log(Y) = \log(\alpha) + \beta * \log(Dose)$ の直線式に書き換えることができ、 Y には C_{max} または $AUC_{0-\infty}$ が、 $Dose$ には用量(本実験では1、2 または 4)が入る。ここで、 β は直線の傾きを示し、算出した β の90%信頼区間に1を含み、なおかつ分散分析にもとづく不適合性の検定が有意でなかった場合($P > 0.05$)に用量比例性があると判断した[30, 39]。 T_{max} 、MRT および $t_{1/2}$ に関して、各用量間での差を検出するために Friedman 検定および Bonferroni 補正による多重比較を用いた。

3. 結果

CEPH モデルの作製

モデル作製には8-15ヵ月(22-42回の注入)を要した。モデル作製前後での血行動態の変化を表4-1に示す。モデル作製後にCOは有意に減少し、PVR および SVR は有意に上昇した($P < 0.05$)。心拍数、SAP、PAWP および RAP は変化しなかった。

表 4-1. 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬作製前後での血行動態パラメータの変化

血行動態パラメータ	作製前	作製後
HR (bpm)	116 (108–128)	92 (81–132)
sPAP (mmHg)	16.4 (13.0–22.7)	36.6 (34.0–42.3)*
mPAP (mmHg)	12.1 (10.6–15.9)	31.5 (28.3–34.7)*
dPAP (mmHg)	9.2 (6.6–10.7)	26.0 (22.2–27.7)*
sSAP (mmHg)	149 (130–151)	144 (134–169)
mSAP (mmHg)	117 (108–130)	115 (102–133)
dSAP (mmHg)	91 (87–97)	96 (81–112)
PAWP (mmHg)	5.4 (3.8–6.6)	5.6 (5.0–6.0)
RAP (mmHg)	2.3 (1.8–2.6)	3.8 (3.3–6.2)
CO (mL/min)	1383 (1084–2328)	1104 (740–1534)*
PVR (Wood units)	5.4 (3.3–6.3)	22.5 (17.7–37.7)*
SVR (Wood units)	84.3 (55.1–100.0)	106.5 (77.7–137.1)*

数値は中央値(最小値–最大値)で示す

* P < 0.05

HR 心拍数; sPAP 収縮期肺動脈圧; mPAP 平均肺動脈圧; dPAP 拡張期肺動脈圧;
sSAP 収縮期全身動脈圧; mSAP 平均全身動脈圧; dSAP 拡張期全身動脈圧; PAWP
肺動脈楔入圧; RAP 右心房圧; CO 心拍出量; PVR 肺血管抵抗; SVR 全身血管抵抗

薬物動態解析

薬物動態試験では明らかな有害反応を認めなかった。縦軸に血漿中シルデナフィル濃度を、そして横軸に時間を示した濃度-時間曲線を図 4-1 に示す。表 4-2 には各用量で算出した薬物動態パラメータを記す。シルデナフィルの T_{max} は 0.9–1.5 時間だった。パワーモデル解析では、 C_{max} (0.62–1.00) および ACU_{inf} (0.65–1.23) それぞれの β の 90%信頼区間が 1 を含んだことから、シルデナフィルが 1、2 および 4 mg/kg の範囲では用量比例性に増加することが判明した。表 4-3 に、本章での C_{max} および ACU_{inf} の値に加え、参考として第 3 章で得た健康犬での結果を記す。CEPH モデル犬では、1 mg/kg 投与後の MRT (3.0–4.7 h) および $t_{1/2}$ (1.9–2.9 h) と比べ、4 mg/kg 投与後の MRT (5.2–5.9 h) および $t_{1/2}$ (3.2–3.8 h) はわずかだが有意に延長した ($P < 0.05$)。 T_{max} 、CL/F および V/F は各用量で異ならなかった。

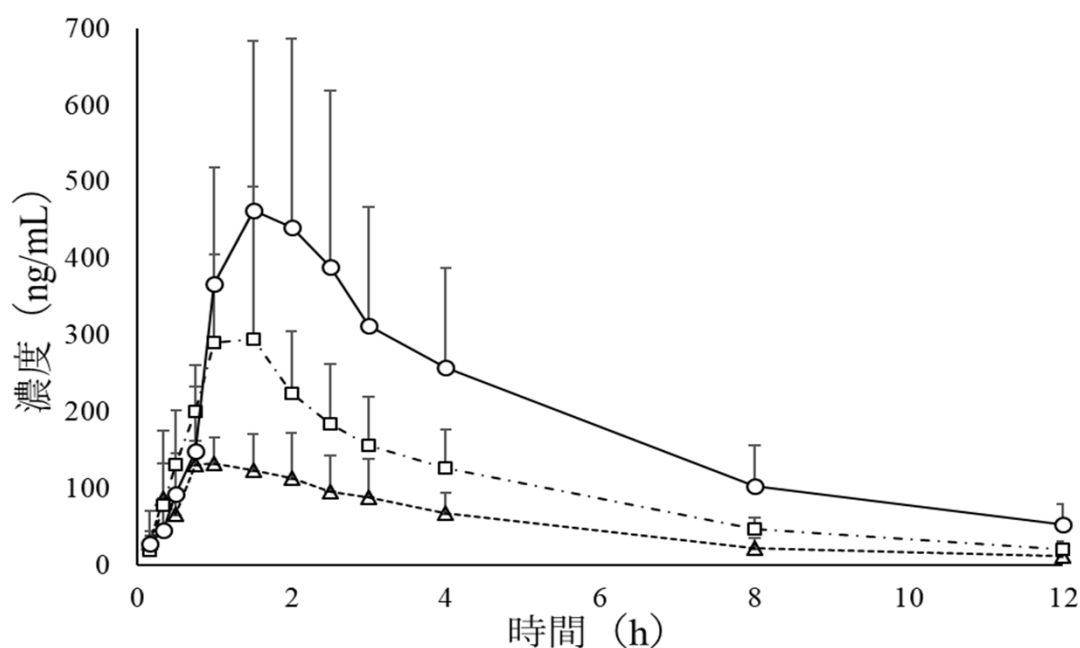


図 4-1. 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬にシルデナフィルを 1(△)、2(□)または 4(○) mg/kg で経口投与した際の血漿中濃度-時間曲線(平均および標準偏差)

表 4-2. 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬にシルденаフィンを 1、2 または 4 mg/kg で経口投与した後の薬物動態

薬物動態パラメータ	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
C _{max} (ng/mL)	157.8 (105.3–197.1)	318.1 (184.6–589.1)	526.1 (259.6–691.1)
T _{max} (h)	0.9 (0.3–2.0)	1.0 (1.0–1.5)	1.5 (1.0–2.0)
AUC _{inf} (ng•h/mL)	625.6 (353.9–1033.8)	1212.2 (872.4–1955.3)	2712.1 (1123.3–3502.0)
MRT (h)	4.2 (3.0–4.7)	4.5 (4.3–5.1)	5.3 (5.2–5.9) *
t _{1/2} (h)	2.8 (1.9–2.9)	3.0 (2.7–3.3)	3.5 (3.2–3.8) *
CL/F (L/h/kg)	1.6 (1.0–2.8)	1.8 (1.0–2.3)	1.6 (1.1–3.6)
V/F (L/kg)	6.4 (4.1–7.8)	7.4 (4.4–10.3)	7.9 (5.3–19.3)

数値は中央値(最小値–最大値)で示す

* P < 0.05 vs. 1 mg/kg

C_{max} 最高血漿中濃度; T_{max} 最高血漿中濃度到達時間; AUC_{inf} 無限時間まで外挿した濃度–時間曲線下面積; MRT 平均滞留時間; t_{1/2} 消失半減期; CL/F 経口クリアランス; V/F 見かけの分布容積

表 4-3. シルденаフィルを 1、2 または 4 mg/kg で経口投与した後の C_{max} および AUC_{inf} の β および 90%信頼区間

	C_{max} (ng/mL)					AUC_{inf} (ng·h/mL)				
	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	β	90% CI	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	β	90% CI
CEPH (n=4)	157.8	318.1	526.1	0.81	0.62–1.00	625.6	1212.2	2712.1	0.94	0.65–1.23
健康犬 (n=5) [†]	170.5	420.5	1053.4	1.33	1.17–1.49	705.4	1355.9	4413.2	1.23	1.07–1.39

[†] 参考として第 3 章で算出した健康犬での結果を下段に示す

C_{max} 最高血漿中濃度; AUC_{inf} 無限時間まで外挿した濃度–時間曲線下面積; CI 信頼区間; CEPH 慢性塞栓性肺高血圧症

4. 考察

本章で、我々はパワーモデル解析を用いることで、CEPH モデル犬でのシルデナフィルの用量比例性を確認した。健康犬ではシルデナフィルの C_{max} および AUC_{inf} が用量非比例性に増加したという点で、CEPH モデル犬では用量比例性に増加した。研究に供試したイヌが異なるため、第 3 章の研究と直接比較できるわけではないが、CEPH モデル犬ではシルデナフィルの用量非比例性が消失した可能性が高いと考えられた。ヒト医学では、CO の低下した心疾患患者では胃消化管虚血がしばしば認められ、消化管での薬剤吸収が低下することが知られている[38, 51]。これは多くの薬剤の吸収が消化管血流量に依存するためである。本章の CEPH モデル犬でも CO が低下したことから、消化管血流量の減少に伴うシルデナフィルの吸収低下が生じたために、用量非比例性が消失した可能性がある。

本モデル犬でのシルデナフィルの消失に関して、MRT および $t_{1/2}$ の 4 mg/kg 投与時での有意な延長の原因は、ヒトの研究が以前に報告しているような CO 減少に起因する腎臓および肝臓への血流量減少に伴う全身クリアランスの低下であると考えられる[61]。しかし、本章での 4 mg/kg 投与時の延長した MRT および $t_{1/2}$ の値は、健康なイヌで得られた値と相違ないため、この程度の消失速度の低下であれば薬物動態学的および臨床的に有意な影響をおよぼさないとと思われる[1]。本章で得た 3 時間という $t_{1/2}$ にもとづくと、イヌに投与したシルデナフィルは、投与頻度にかかわらず 15–18 時間で定常状態に達すると思われる。したがって、1 日 1 回または 2 回の投与と比べ、1 日 3 回投与の方が定常状態時の濃度をより高く維持でき、治療効果をより増強できるかもしれない。

イヌの心疾患で最も遭遇する機会が多いのは MMVD であり、それに続発する PH の発生も多い。ある報告では、MMVD 罹患犬の 14–65 %が PH を併発していた[5, 34, 45, 87]。MMVD では、僧帽弁閉鎖不全症により左室内の血液が左房内へと逆流し、全身に向かう前方拍出量が減少する。この低下に対し、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系および交感神経系といった代償機構が働くが、それでも前方拍出量は健康時から 15–30 %ほど低下したままであることが知られている[20]。MMVD では、そのような病態下で PH を合併することで、心拍出量がさらに低下することが予想される。本モデルで生じた主要な血行動態変化は、全身のうっ血ではなく、CO の低下だった。したがって、前方拍出量の低下をきたす MMVD およびそれに続発する PH 罹患犬でも、CEPH モデル犬と同様の薬物動態変化が

生じ、シルデナフィルの吸収が低下する可能性がある。

本章では、鼠径部の発赤、嘔吐または下痢といったシルデナフィルの投与に関連した明らかな有害反応は認められなかった[65]。この所見は、PH のイヌでの高用量のシルデナフィルの投与の安全性を裏付けるものかもしれない。しかし、本章ではすべての有害反応を評価したわけではないため、シルデナフィルの投与の安全性に関してさらなる研究が必要と思われる。

本章にはいくつかの制限がある。第 1 に、シルデナフィルの静脈内投与後の薬物動態解析が実施できなかった。このため、各用量を投与した際のバイオアベイラビリティを算出することができず、シルデナフィルの吸収および代謝に対する PH の影響をより詳細に評価できなかった。第 2 に、実験に用いたイヌがすべてメスだったことである。性別に関連したシルデナフィルの薬物動態の違いを評価するためには、雌雄両方を用いた試験の実施が必要である。第 3 に、観血的測定法ではなく、非観血的測定方法のオシロメトリック法により血圧測定を実施したことである。明らかな有害反応を呈したイヌはいなかったが、これによりシルデナフィルの血管拡張作用に関連した有害反応を見逃したかもしれない。最後に、実験に供したイヌの数が少なかったために、統計学的有意性を見逃した可能性は否定できない。

5. 小括

本章では、実験的に作製した慢性 PH モデル犬でのシルデナフィルの薬物動態を評価した。

その結果、CEPH モデル犬に経口投与したシルデナフィルの血漿中濃度は投与後 1–2 時間で最高値に達することが判明した。また、 C_{max} および AUC_{inf} は 1、2 および 4 mg/kg の範囲で用量比例性に増加した。4 mg/kg 投与時の MRT および $t_{1/2}$ は 1 mg/kg 投与時と比べ有意に延長したが、その変化はわずかだったため、臨床的な重要性は低く、健康犬と変わらぬ投与頻度で投薬可能と判断した。そして CEPH モデル犬でのシルデナフィルの $t_{1/2}$ が、健康犬と変わらず 3 時間だったため、15–18 時間で定常状態に達すると判明した。したがって、次章の研究では、臨床現場での投薬状況を想定し、シルデナフィルを 7 日間投薬することで定常状態での薬効を評価することとした。

第5章

慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬の
血行動態に対するシルデナフィルの
短期的効果の評価

1. 緒言

獣医学では、先天性心疾患による肺血管血流量増大、左心疾患による肺静脈うっ血、呼吸器疾患による低酸素性肺血管攣縮および肺血栓塞栓症といった様々な疾患に続発した肺高血圧症(PH)のイヌに経口投与したシルデナフィルが、臨床徴候および生活の質(QOL)スコアを改善させ、心エコー図検査から推測した三尖弁逆流圧較差(TRPG)を低下させることが判明している[3, 7, 9, 47, 48, 92, 93]。いっぽうヒトでは、右心カテーテル検査(RHC)の実施が容易であり、臨床徴候および QOL スコアといった主観的および半定量的な評価にとどまらず、覚醒下の患者での各種薬剤の効果を定量的に評価可能である[71]。そのため、PHの患者を組み込んだヒトの研究では、シルデナフィルが用量依存性に肺動脈圧(PAP)および肺血管抵抗を低下させることが証明されている[25, 77]。しかし、獣医臨床現場では、全身麻酔のリスク、合併症および高額な費用といった理由により RHC の実施が困難であるため、PHのイヌの肺および全身血行動態に対する様々な用量のシルデナフィルの影響をRHCで定量的に評価した研究はない。したがって、本章では実験的に作製した慢性 PH モデル犬の肺および全身血行動態に対するシルデナフィルの効果を定量的に調査することを目的とした。

2. 材料および方法

本学獣医内科学研究室第二で管理している臨床的に健康な雌のビーグル犬4頭(3–8歳、8.4–11.3 kg)を用いた。イヌは1頭ずつ個別にケージで飼育し、市販のドライフードを給与して管理した。本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て実験を行った(承認番号 29S–24)。

右心カテーテル検査(RHC)および慢性塞栓性肺高血圧症(CEPH)モデル作製

第2および4章と同様、プロポフォール(6 mg/kg, IV)を用いて導入したイヌに挿管を行い、同剤の持続点滴(0.1–0.2 mg/kg, IV)で麻酔を維持した[8, 86]。横臥位にした麻酔下のイヌの頸静脈に4または5 Frのシース(Catheter Introducer, Medikit, Japan)を経皮的に設置し、4 Frのカテーテル(Wedge Pressure Catheter, Harmac Medical Products, USA)または5 Frのカテーテル(Swan-Ganz Catheter, Edwards Lifesciences, USA)を挿入した。較正済みの圧ト

ランスデューサにカテーテルを接続し血圧を測定しつつ、右房および右室を経て肺動脈へと進めた。肺動脈まで達した後、プロポフォール®の注入を止め、イヌを覚醒させた。その後60–90分間安置し、自力歩行を確認した後、横臥位にて血行動態パラメータを測定した。モデル作製途中の計測は収縮期、平均および拡張期肺動脈圧(それぞれ sPAP、mPAP および dPAP)のみとした。第4章と同様、モデル作製前後に右房圧(RAP)、肺動脈楔入圧(PAWP)および心拍出量(CO)を測定した。COは5Frのカテーテルを用いて熱希釈法により測定した。RHCと同時に、オシロメトリック法の血圧計(PetMap, Ramsey Medical, USA)を用いて収縮期、平均および拡張期の全身動脈圧(それぞれ sSAP、mSAP および dSAP)を測定した。また、肺および全身血管抵抗(それぞれ PVR および SVR)を以下の式より算出した: 1) $PVR [\text{Wood units}] = (\text{mPAP} [\text{mmHg}] - \text{PAWP} [\text{mmHg}]) / \text{CO} (\text{L}/\text{min})$ 、2) $\text{SVR} [\text{Wood units}] = (\text{mSAP} [\text{mmHg}] - \text{RAP} [\text{mmHg}]) / \text{CO} (\text{L}/\text{min})$ 。

CEPHモデルは過去の報告にもとづき、カテーテルから直径100–300 μmのマイクロスフェア(Sephadex, GE Healthcare, USA)を間欠的に注入することで作製した[36, 73]。sPAPが40–50 mmHgになるようマイクロスフェアの注入量を調整した。以前の報告と同様、数日でPAPの低下が見られたため、上記の処置を約1週間に1回の頻度で実施し、sPAPおよびmPAPがそれぞれ30および20 mmHgを超えるまで徐々にPAPを上昇させた[73]。第4章と同様、1ヵ月間マイクロスフェアを注入しなくてもなおsPAPおよびmPAPがそれぞれ30および20 mmHgを超えていた場合にモデル作製完了と、投薬実験を実施した。

シルデナフィルの投与

モデル犬に対し、シルデナフィル(Viagra[®], Pfizer, USA)を1、2または4 mg/kgいずれかの用量で1日2回、7日間経口投与した。最低1週間のウォッシュアウト期間後、残りの用量のいずれかを無作為に経口投与した。これをすべてのイヌがすべての用量の投薬を受けるまで続けた。フードの給与は投薬して1.5–2時間後に行った。投薬期間中、皮膚の発赤、虚脱、嘔吐、下痢および神経症状の有無を観察した。

統計解析

統計解析には市販のソフトウェア(SPSS Statistics 24.0, IBM)を用いた。Shapiro–Wilk検定

により正規性を評価した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。モデル作製開始時(BL)およびCEPH時の各パラメータの比較には対応のあるt検定またはWilcoxon符号付き順位検定を用いた。1要因の反復測定分散分析および修正Bonferroni法による多重比較を用いて、モデル完成時(つまりシルデナフィル投与前)および各用量でのシルデナフィル投薬後の血行動態パラメータを比較した。

3. 結果

CEPHモデルの作製

モデル作製には8-15ヵ月(22-42回の注入)を要した。モデル作製前後での血行動態の変化を表5-1に示す。モデル作製後にCOは有意に減少し、PVRおよびSVRは有意に上昇した($P < 0.05$)。HR、SAP、PAWPおよびRAPは変化しなかった。なお、本表は第4章の結果(表4-1)に示したものと同一である。

表 5-1. 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬作製前後での血行動態パラメータの変化

血行動態パラメータ	作製前	作製後
HR (bpm)	116 (108–128)	92 (81–132)
sPAP (mmHg)	16.4 (13.0–22.7)	36.6 (34.0–42.3)*
mPAP (mmHg)	12.1 (10.6–15.9)	31.5 (28.3–34.7)*
dPAP (mmHg)	9.2 (6.6–10.7)	26.0 (22.2–27.7)*
sSAP (mmHg)	149 (130–151)	144 (134–169)
mSAP (mmHg)	117 (108–130)	115 (102–133)
dSAP (mmHg)	91 (87–97)	96 (81–112)
PAWP (mmHg)	5.4 (3.8–6.6)	5.6 (5.0–6.0)
RAP (mmHg)	2.3 (1.8–2.6)	3.8 (3.3–6.2)
CO (mL/min)	1383 (1084–2328)	1104 (740–1534)*
PVR (Wood units)	5.4 (3.3–6.3)	22.5 (17.7–37.7)*
SVR (Wood units)	84.3 (55.1–100.0)	106.5 (77.7–137.1)*

数値は中央値(最小値–最大値)で示す

* P < 0.05

HR 心拍数; sPAP 収縮期肺動脈圧; mPAP 平均肺動脈圧; dPAP 拡張期肺動脈圧;
sSAP 収縮期全身動脈圧; mSAP 平均全身動脈圧; dSAP 拡張期全身動脈圧; PAWP
肺動脈楔入圧; RAP 右房圧; CO 心拍出量; PVR 肺血管抵抗; SVR 全身血管抵抗

肺および全身血行動態に対するシルデナフィルの効果

本実験ではシルデナフィルの投薬に関連した明らかな有害反応を認めなかった。各用量でのシルデナフィル投薬後の血行動態パラメータを表 5-2 に示す。投薬前と比べ、2 および 4 mg/kg 投与時に sPAP が有意に低下し(それぞれ $P < 0.01$)、1 mg/kg 投与時と比べ 4 mg/kg 投与時に有意 ($P < 0.05$) に低値を示した(図 5-1)。また、投薬前と比べ 1、2 および 4 mg/kg すべての用量で mPAP および dPAP が有意に低下し(それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ および $P < 0.01$)、1 mg/kg 投与時と比べ 4 mg/kg 投与時に有意 ($P < 0.05$) に低値を示した(図 5-2 および 5-3)。そして、PVR は投薬前と比べ 1、2 および 4 mg/kg すべての用量で有意に低下した(図 5-4、それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ および $P < 0.01$)。HR、SAP、PAWP、RAP、CO および SVR はいかなる用量でも有意に変化しなかった。

表 5-2. シルデナフィルを 1、2 または 4 mg/kg で 1 週間経口投与した後の肺および全身血行動態パラメータの変化

血行動態パラメータ	CEPH	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
HR (bpm)	92 (81–132)	118 (95–124)	94 (82–116)	96 (83–120)
sPAP (mmHg)	36.6 (34.0–42.3)	34.1 (28.2–39.2)	30.7 (25.8–33.7) ^b	26.1 (23.1–30.0) ^{b,c}
mPAP (mmHg)	31.5 (28.3–34.7)	26.9 (23.3–31.0) ^a	24.5 (19.3–25.9) ^b	21.1 (18.4–25.5) ^{b,c}
dPAP (mmHg)	26.0 (22.2–27.7)	20.6 (18.5–23.2) ^a	18.2 (17.2–19.6) ^a	15.2 (13.7–22.3) ^{b,c}
sSAP (mmHg)	144 (134–169)	150 (144–160)	141 (135–161)	143 (128–159)
mSAP (mmHg)	115 (102–133)	109 (98–120)	104 (88–118)	102 (98–120)
dSAP (mmHg)	96 (81–112)	88 (78–92)	79 (60–91)	86 (70–95)
PAWP (mmHg)	5.6 (5.0–6.0)	5.1 (4.7–9.2)	4.4 (3.2–9.2)	5.8 (5.3–8.0)
RAP (mmHg)	3.8 (3.3–6.2)	3.3 (2.7–3.4)	2.6 (2.2–3.6)	2.1 (1.8–3.4)
CO (mL/min)	1104 (740–1534)	1383 (898–1671)	1364 (778–1658)	1410 (899–1581)
PVR (Wood units)	22.5 (17.7–37.7)	15.2 (9.2–28.8) ^a	13.3 (8.4–28.7) ^b	10.3 (7.9–22.5) ^b
SVR (Wood units)	106.5 (77.7–137.1)	78.8 (61.8–117.7)	73.8 (60.5–131.8)	77.1 (59.9–111.3)

数値は中央値(最小値–最大値)で示す

^a P < 0.05 vs. CEPH

(表2 脚注 つづき)

^b P<0.01 vs. CEPH

^c P<0.05 vs. 1 mg/kg

HR 心拍数; sPAP 収縮期肺動脈圧; mPAP 平均肺動脈圧; dPAP 拡張期肺動脈圧; sSAP 収縮期全身動脈圧; mSAP 平均全身動脈圧;
dSAP 拡張期全身動脈圧; PAWP 肺動脈楔入圧; RAP 右房圧; CO 心拍出量; PVR 肺血管抵抗; SVR 全身血管抵抗; CEPH 慢性塞栓性
肺高血圧症

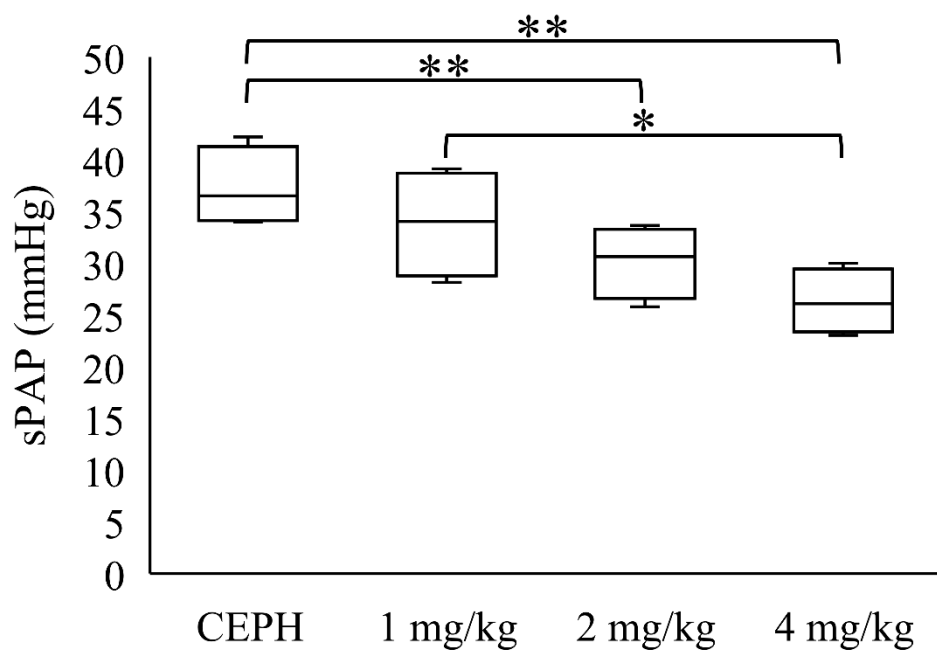


図5-1. シルденаフィルを1、2または4 mg/kg で1週間経口投与した後の収縮期肺動脈圧 (sPAP)の変化

箱の下限、中央および上限はそれぞれ第一四分位数、中央値および第三四分位数を示し、上下のひげはそれぞれ最大値および最小値を示す。* P<0.05、** P<0.01

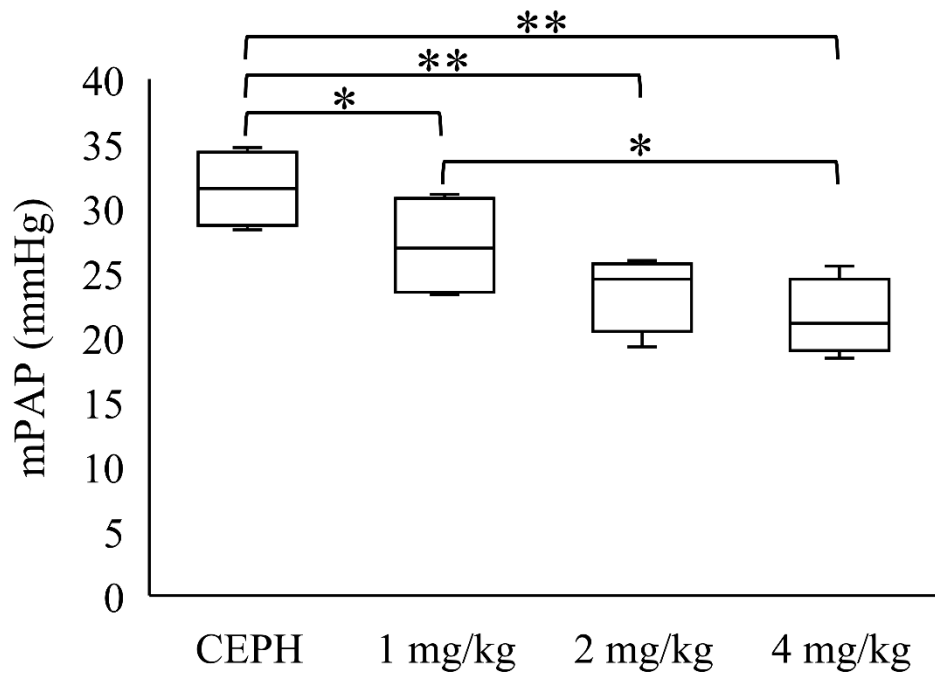


図5-2. シルデナフィルを1、2または4 mg/kg で1週間経口投与した後の平均肺動脈圧 (mPAP)の変化

箱の下限、中央および上限はそれぞれ第一四分位数、中央値および第三四分位数を示し、上下のひげはそれぞれ最大値および最小値を示す。* P<0.05、** P<0.01

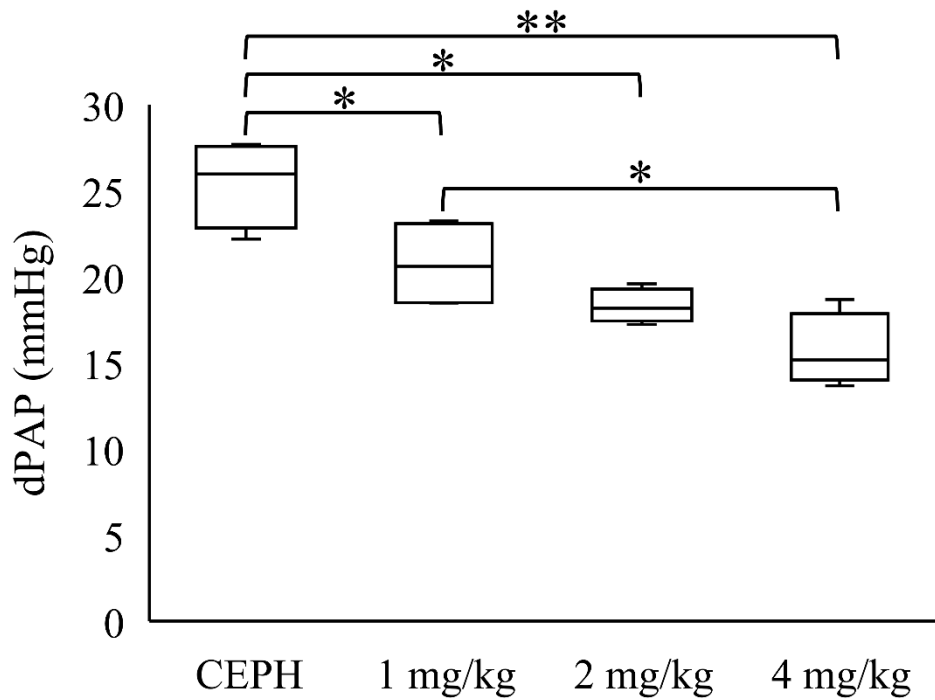


図5-3. シルденаフィルを1、2または4 mg/kg で1週間経口投与した後の拡張期肺動脈圧 (dPAP) の変化

箱の下限、中央および上限はそれぞれ第一四分位数、中央値および第三四分位数を示し、上下のひげはそれぞれ最大値および最小値を示す。* P<0.05、** P<0.01

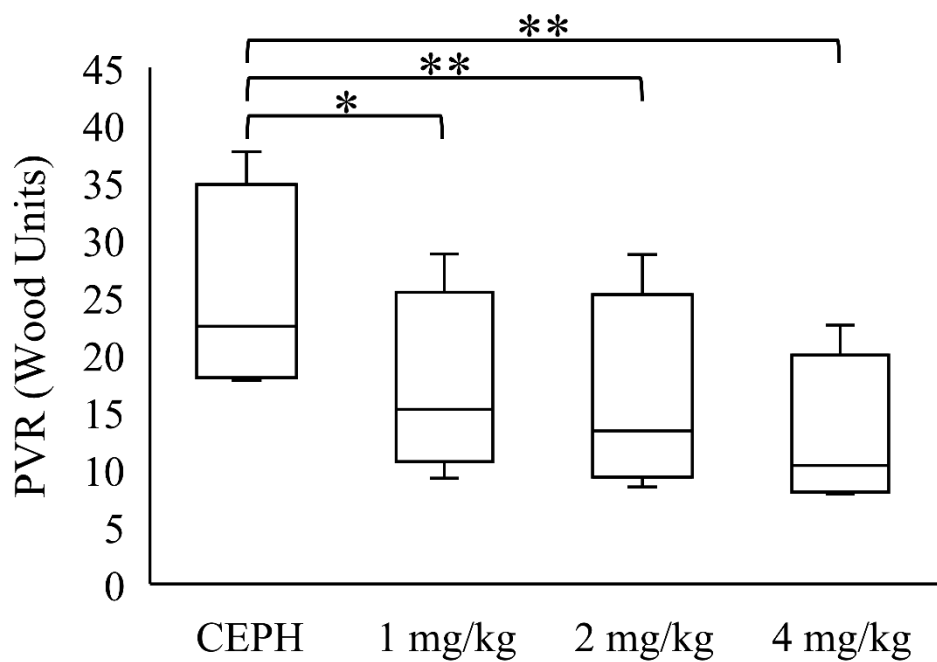


図5-4. シルденаフィルを1、2または4 mg/kg で1週間経口投与した後の肺血管抵抗 (PVR)の変化

箱の下限、中央および上限はそれぞれ第一四分位数、中央値および第三四分位数を示し、上下のひげはそれぞれ最大値および最小値を示す。* P<0.05、** P<0.01

4. 考察

高い選択性を有するホスホジエステラーゼ (PDE)-5 阻害薬のシルデナフィルは、PDE-5 による環状グアノシンーリン酸 (cGMP) の加水分解を遮断することで肺動脈を拡張させる[11, 25]。ヒトではシルデナフィルをはじめとした各治療薬の効果を RHC で客観的かつ定量的に評価することが容易だが、獣医臨床現場では、全身麻酔のリスク、合併症および高額な費用のため、RHC が実施可能となるのは稀である。したがって、PH のイヌの肺および全身血行動態に対する様々な用量のシルデナフィルの影響を客観的かつ定量的に評価した研究はなく、本章での研究が最初の報告である。

本章で、シルデナフィルは SAP および SVR を変化させることなく PVR を有意に低下させた。これは、PH のイヌでシルデナフィルが主に全身動脈ではなく肺動脈を拡張させることを示している。また、我々は、経口投与したシルデナフィルが sPAP、mPAP および dPAP を用量依存性に低下させることを示した。CO こそ有意に上昇しなかったものの、本結果はヒトで報告されているシルデナフィルの薬理効果と一致し、PH のイヌにシルデナフィルを 4 mg/kg で投与することでさらなる治療効果を期待できると思われる[25, 77]。しかしヒト医学では、左心疾患由来の PH への投与により肺血流量が増加し、肺静脈うっ血を助長するかもしれないという懸念から、シルデナフィルの使用は肺動脈性肺高血圧症などの特定の PH のみに限られる[27]。対照的に、イヌでのシルデナフィルの有用性を報告した上述の研究では、左心疾患に続発した PH を多数含んでいるうえ、肺静脈うっ血が原因と思われる臨床徴候の悪化を報告したものはない[3, 7, 9, 47, 48, 92, 93]。したがって、様々な疾患由来の PH 集団からシルデナフィル投与に適した動物を特定するためのさらなる研究が必要である。

シルデナフィルの薬物動態に関し、第4章の研究にて、PH モデル犬でのシルデナフィルの半減期が 3 時間であり、投与頻度にかかわらず 15–18 時間で定常状態に達することを示した。本章では以前の報告にもとづいて用量を決定し、各用量のシルデナフィルを 1 日 2 回、7 日間投薬した[3, 59, 92]。つまり、本章の研究で得られた結果は、PH のイヌの肺および全身血行動態に対するシルデナフィルの定常状態での効果を反映すると考えられる。シルデナフィルの長期投与の安全性に関するさらなる調査が必要ではあるが、ご家族の投薬アドヒアランスが得られれば、1 日 2 回の投薬と比べ 1 日 3 回の投薬により定常状態の血漿中濃度をより高く維持することができ、治療効果を増強できるかもしれない。

本章にはいくつかの制限がある。第1に、実験に供したイヌの数が少ないことである。これにより、統計学的有意性を見逃した可能性がある。第2に、本実験ではCEPHモデルを用いているため、シルデナフィルが自然発生性PH、特にイヌでの発生が最も多い僧帽弁閉鎖不全症に続発したPHでは同様の薬理効果を示さない可能性がある。第3に、血圧測定に際し、非観血的測定方法のオシロメトリック法を用いたため、SAPの正確性を欠いた可能性がある。第4に、本実験では1週間を超えるシルデナフィルの長期投与を実施していないため、本実験での投薬期間を超えた場合に有害反応が生じる可能性を否定できない。最後に、同一のイヌに対し複数回の麻酔を実施したことが挙げられる。麻酔後に十分な時間を設けイヌを覚醒させたものの、プロポフォールによる麻酔がCEPHモデル犬の血行動態およびシルデナフィルの薬理効果に影響した可能性を完全には除外できない。

5. 小括

本章では、実験的に作製した慢性PHモデル犬の肺および全身血行動態に対するシルデナフィルの短期的効果を評価した。

結果として、シルデナフィルの経口投与により、投与前と比較してPAPは有意に低下した。また、シルデナフィルを4mg/kgで投与することで、1mg/kg投与時よりも有意にPAPが低下した。したがって、シルデナフィルは用量依存性に肺血管を拡張させ、PAPを低下させることが判明した。加えて、いずれの用量でシルデナフィルを投与してもSAP、SVR、RAP、PAWP、COは変化せず、PVRのみが有意に低下した。以上より、シルデナフィルは1mg/kgから投与を開始し、必要に応じて増量することで、全身血行動態への明らかな悪影響を伴わずに治療効果を増強可能と思われる。

第6章

総括

本研究では、近年提唱されている右心系心エコー図検査パラメータおよび観血的な肺動脈圧(PAP)の関連性の調査に加え、イヌの肺高血圧症(PH)の治療薬として使用する機会が多いシルデナフィルの薬物動態および薬力学を評価した。

第1章では、イヌでのPHの定義、疫学、病態および予後といった概要を述べ、続いてPHの診断および評価に用いる検査の利点や欠点、不明点を指摘した。最後に、PHの治療薬として最も頻繁に用いられているシルデナフィルの薬物動態および薬力学上の不明点をヒトでの研究を列挙しつつ述べ、これらを実験することの重要性を指摘した。

第2章 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬での右心系心エコー図検査パラメータおよび観血的な肺動脈圧測定値の関連性の評価

獣医学では、PH診断のゴールドスタンダードである右心カテーテル検査(RHC)の実施が困難なため、心エコー図検査により計測した三尖弁逆流(TR)または肺動脈弁逆流(PR)血流速にもとづき診断が下される。近年、PAPの上昇を示唆する右心系心エコー図検査パラメータがいくつか提唱されているが、これらパラメータおよび観血的に測定したPAPの関連性を調査した研究は極めて少ない。よって本章では、PHモデル作製前後での右心系心エコー図検査パラメータおよびRHCで測定したPAPの関連性を調査した。臨床的に健康な5頭のイヌを用い、肺動脈に直径100–300 μm のマイクロスフェアを複数回注入することで慢性塞栓性肺高血圧症(CEPH)モデルを作製した。心エコー図検査をモデル作製前後で実施し、各種右心系の心エコー図検査パラメータを測定した。

その結果、体重で標準化した拡張期右室内径(RVIDdn)、肺動脈/大動脈内径比(PA/Ao)、肺動脈血流の加速時間/駆出時間比(AT/ET)、そして体重で標準化した三尖弁輪収縮期移動距離(TAPSEn)が、観血的に測定した収縮期および平均肺動脈圧(sPAPおよびmPAP)と相関した。いっぽうで、PA/Aoのみが観血的に測定した拡張期肺動脈圧(dPAP)と相関した。重回帰分析では、AT/ETおよびRVIDdnがsPAPに独立して影響し、そしてPA/AoおよびRVIDdnがmPAPに独立して影響する因子だった。加えて、AT/ET(カットオフ値; 0.45、感度100%および特異度100%)およびPA/Ao(カットオフ値; 0.97、感度100%および特異度80%)は高い精度でCEPHを予測した。TRおよびPR血流速は、観血的に測定したPAPと有意に関連しなかった。

以上より、TR または PR が存在しなくとも、上述の心エコー図検査パラメータの変化により PH を精度よく予測するとともに、PAP 上昇に関連した右心系の変化を評価することが可能である。

第 3 章 臨床的に健康なイヌに単回経口投与したシルデナフィルの薬物動態

： 食事の影響および用量比例性の評価

イヌでのシルデナフィルの薬物動態に関する報告は非常に限られており、投与量および投薬頻度を決定する上での基本的な情報が乏しいのが現状である。したがって、本章では、臨床的に健康なイヌに経口投与したシルデナフィルの薬物動態特性、食事の影響および用量比例性を評価することを目的とした。

6 頭のイヌを用いたクロスオーバー法により、シルデナフィルの薬物動態に対する食事の影響を調査した。加えて、5 頭のイヌを用いたクロスオーバー法により、1、2 および 4 mg/kg のシルデナフィルの用量比例性を評価した。血漿中シルデナフィル濃度は高速液体クロマトグラフィー法により測定し、モーメント解析を用いて薬物動態を評価した。

結果として、シルデナフィルの最高血漿中濃度到達時間(T_{max})は 1.2 時間であり、フードの給与により最高血漿中濃度(C_{max}) および無限時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積(AUC_{inf})が絶食時に比べそれぞれ 42 および 20 %低下した。絶食時とフード給与時で半減期($t_{1/2}$)に有意な差はなく、それぞれ 2.8 および 3.2 時間だった。また、パワーモデル解析を用いることで、1、2 および 4 mg/kg の範囲で C_{max} (1 mg/kg; 170.5, 2 mg/kg; 420.5, 4 mg/kg; 1053.4 ng/mL) および AUC_{inf} (1 mg/kg; 705.4, 2 mg/kg; 1355.9, 4 mg/kg; 4413.2 ng · h/mL) の用量非比例性の増加を確認した。

以上から、シルデナフィルを食事の 1-2 時間前に投与することで、フードの給与による吸収の低下を抑え、より高い血中濃度を達成できることが判明した。また、本章で認めた用量非比例性は、イヌでのシルデナフィルの主要な代謝臓器である肝臓での代謝飽和に起因するものと考えられた。以上の所見は PH のイヌで生じ得るシルデナフィルの薬物動態変化を検出するとともに、この薬剤の投与量および投与頻度を決定する上での基礎的な情報となる。

第 4 章 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬に単回経口投与したシルデナフィルの薬物動態

シルデナフィルはイヌの PH の治療薬として投与する機会が多いホスホジエステラーゼ (PDE)-5 阻害薬である。しかし、PH 罹患犬でのこの薬剤の薬物動態に関する情報は限られており、詳細は不明のままである。したがって本章では、実験的に作製した CEPH モデルでのシルデナフィルの薬物動態を評価した。

CEPH モデルは、臨床的に健康な 4 頭のイヌの肺動脈内に直径 100–300 μm のマイクロスフェアを複数回注入することで作製した。そして 4 頭のモデル犬を用いたクロスオーバー法により、絶食下にて 1、2 および 4 mg/kg のシルデナフィルの薬物動態を評価した。血漿中シルデナフィル濃度は高速液体クロマトグラフィー法により測定し、モーメント解析を用いて薬物動態を評価した。

その結果、CEPH モデル作製前後で心拍出量の有意な低下が見られ、薬物動態試験では C_{max} (1 mg/kg; 157.8, 2 mg/kg; 318.1, 4 mg/kg; 526.1 ng/mL) および AUC_{inf} (1 mg/kg; 625.6, 2 mg/kg; 1212.2, 4 mg/kg; 2712.1 ng · h/mL) が用量に比例して増加した。各用量間で T_{max} に有意差は認められず 0.9–1.5 h だったが、 $t_{1/2}$ および平均滞留時間 (MRT) が 1 mg/kg 投与時 ($t_{1/2}$; 2.8 h, MRT; 4.2 h) と比較して 4 mg/kg 投与時 ($t_{1/2}$; 3.5 h, MRT; 5.3 h) に軽度だが有意に延長していた。

以上より、本章で作製した CEPH モデル犬では、健康犬で認められたシルデナフィルの用量非比例性が消失し、用量比例性に C_{max} および AUC_{inf} が増加した。供試したイヌが異なるため、第 3 章の研究と直接比較はできないものの、本章の CEPH モデルでは心拍出量が有意に低下したことから、心疾患のヒト患者で述べられている消化管血流量の低下に起因する薬物の吸収障害が起き、 C_{max} および AUC_{inf} が予想より上昇しなかったと考えられた。また、4 mg/kg 投与時に $t_{1/2}$ および MRT が延長したものの、健康犬と比べ数値の変化はわずかであり、臨床的な重要性は低いことが判明した。

第 5 章 慢性塞栓性肺高血圧症モデル犬の血行動態に対するシルデナフィルの

短期的効果の評価

獣医臨床現場では、全身麻酔のリスク、合併症および高額な費用といった理由により RHC の実施が困難であるため、PH のイヌの肺および全身血行動態に対する様々な用量のシルデナフィルの影響を定量的に評価した研究は非常に限られている。したがって本章では、

実験的に作製した CEPH モデルの血行動態に対するシルデナフィルの効果を定量的に評価した。

CEPH モデルは、臨床的に健康な 4 頭のイヌの肺動脈内に直径 100–300 μm のマイクロスフェアを複数回注入することで作製した。そして、モデル犬に 1、2 または 4 mg/kg いずれかの用量のシルデナフィルを無作為に 1 週間経口投与し、投与前後での各血行動態パラメータを比較した。少なくとも 1 週間のウォッシュアウト期間後、残りの用量を無作為に経口投与し、すべてのイヌにすべての用量を投与するまで続けた。

結果として、2 および 4 mg/kg で投与したシルデナフィルは、投与前と比較して sPAP を有意に低下させた。加えて、1、2 および 4 mg/kg すべての用量のシルデナフィルが、投与前と比較して mPAP および dPAP を有意に低下させた。そのうえ、4 mg/kg で投与したシルデナフィルは、1 mg/kg 投与時と比較して PAP を有意に低下させた。また、シルデナフィルは、全身動脈圧および全身血管抵抗を変化させることなく、肺血管抵抗を有意に低下させた。肺動脈楔入圧、右房圧および心拍出量はいかなる用量でも変化しなかった。

以上より、経口投与したシルデナフィルは PH のイヌの肺動脈を選択的に拡張させ、用量に比例して PAP を低下させることが判明した。1 mg/kg で PAP の有意な低下が生じたことから、PH のイヌでは 1 mg/kg から投薬を開始し、ご家族の経済状況と相談しつつ必要に応じて増量することで効果を増強することが可能である。

本研究の結論

本研究により、右心系の心エコー図検査パラメータの一部および観血的な PAP との関連性に加え、PH のイヌに経口投与したシルデナフィルの薬物動態および薬効を解明した。

本研究では右心系心エコー図検査パラメータおよび観血的な PAP の関連性を報告し、TR や PR がなくとも PH を判定できるパラメータを用いた点で価値がある。したがって、PH の検出あるいは病態評価に際し、TR や PR から推定した圧較差のみを用いた評価にとどまらず、本研究で調査したパラメータを用いて多角的に病態を捉えることで、PH 罹患犬の状態をより詳細に評価可能である。

また、PH の治療に際し、シルデナフィルは薬価の面でご家族にとって相当な負担になり得る薬剤である。そのため、経口投与したシルデナフィルの最大限の効果を期待し、消化管

からの吸収を低下させないためにも、フードを与える 1-2 時間前に投薬をすることが望ましいことも本研究で初めて明らかになった。PH により消化管からの吸収低下が生じた可能性があることから、シルデナフィルを投与する際には、本研究で示した薬物動態の変化を考慮して投与量および投薬頻度を決定する必要がある。

そして治療効果に関し、1、2 および 4 mg/kg いずれの用量でも明らかな有害反応は見られず、全身動脈圧を変化させることなく PAP を有意に低下させることも本研究により明らかになった。したがって、シルデナフィルの投与が必要と判断した PH のイヌには 1 mg/kg から投与を開始し、治療反応やご家族の経済状況を踏まえつつ、必要に応じて増量することで、全身血行動態への有害な影響を及ぼさずに治療効果を増強可能である。

参考文献

1. Akabane R, Sato T, Sakatani A, Miyagawa Y, Tazaki H, Takemura N. Pharmacokinetics of single-dose sildenafil administered orally in clinically healthy dogs: Effect of feeding and dose proportionality. *J Vet Pharmacol Ther.* 2018; 41: 457–462.
2. Al-Mohizea AM, Ahad A., El-Maghraby GM, Al-Jenoobi FI., AlKharfy KM, Al-Suwayeh SA. Effects of *Nigella sativa*, *Lepidium sativum* and *Trigonella foenum-graecum* on sildenafil disposition in beagle dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2015; 40: 219–224.
3. Bach JF, Rozanski EA, MacGregor J, Betkowski JM, Rush JE. Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.* 2006; 20: 1132–1135.
4. Boon JA. Hypertensive heart disease. In: *Veterinary Echocardiography.* 2nd ed. Wiley-Blackwell. 2011; 335–358.
5. Borgarelli M, Abbott J, Braz-Ruivo L, Chiavegato D, Crosara S, Lamb K, Ljungvall M, Poggi M, Santilli RA, Haggstrom J. *J Vet Intern Med.* 2015; 29: 569–574.
6. Breitling S, Ravindran K, Goldenberg NM, Kuebler WM. The pathophysiology of pulmonary hypertension in left heart disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 309: 924–941.
7. Brown AJ, Davison E, Sleeper MM. Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.* 2010; 24: 850–854.
8. Bustamante R, Aguado D, Cediel R, Gómez de Segura IA, Canfrán S. Clinical comparison of the effects of isoflurane or propofol anaesthesia on mean arterial blood pressure and ventilation in dogs undergoing orthopaedic surgery receiving epidural anaesthesia. *Vet J.* 2018; 233: 49–54.
9. Califf RM, Adams KF, McKenna WJ, Gheorghiade M, Uretsky BF, McNulty SE, Darius H, Schulman K, Zannad F, Handberg-Thurmond E, Harrell FE Jr, Wheeler W, Soler-Soler J, Swedberg K. A randomized controlled trial of epoprostenol therapy for severe congestive heart failure: The Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J.* 1997; 134: 44–54.
10. Chapel EH, Scansen BA, Schober KE, Bonagura JD. Echocardiographic estimates of right

- ventricular systolic function in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2018; 32: 64–71.
11. Chaumais MC, Perrin S, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M, Montani D. Pharmacokinetic evaluation of sildenafil as a pulmonary hypertension treatment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013; 9: 1193–1205.
 12. Chiavegato D, Borgarelli M, D'Agnolo G, Santilli RA. Pulmonary hypertension in dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Vet Radiol Ultrasound.* 2009; 50: 253–258.
 13. Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis, SH. High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334: 930–938.
 14. Cordina RL, Playford D, Lang I, Celermajer DS. State-of-the-art review: echocardiography in pulmonary hypertension. *Heart Lung Circ.* 2019, In Press.
 15. Cornell CC, Kittleson MD, Della Torre P, Häggström J, Lombard CW, Pedersen HD, Vollmar A, Wey A. Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med.* 2004; 18: 311–321.
 16. D'Alto M, Romeo E, Argiento P, D'Andrea A, Vanderpool R, Corra A, Bossone E, Sarubbi B, Calabrò R, Russo MG, Naeije R. Accuracy and precision of echocardiography versus right heart catheterization for the assessment of pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* 2013; 168: 4058–4062.
 17. Dias-Junior CA, Vieira TF, Moreno H Jr, Evora PR, Tanus-Santos JE. Sildenafil selectively inhibits acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005; 18: 181–186.
 18. Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, da Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg.* 2005; 101: 115–120.
 19. Dias-Junior CA, Tanus-Santos JE. Hemodynamic effects of sildenafil interaction with a nitric oxide donor compound in a dog model of acute pulmonary embolism. *Life Sci.* 2006; 79: 469–

474.

20. Dillon AR, Dell'Italia LJ, Tillson M, Killingsworth C, Denney T, Hathcock J, Botzman L. Left ventricular remodeling in preclinical experimental mitral regurgitation of dogs. *J Vet Cardiol.* 2012; 14: 73–92.
21. Farber HW, Foreman AJ, Miller DP, McGoon MD. REVEAL Registry: correlation of right heart catheterization and echocardiography in patients with pulmonary arterial hypertension. *Congest Heart Fail.* 2011; 17: 56–64.
22. Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, Corretti MC, Hassoun PM. Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179: 615–621.
23. Fukumoto S, Hanazono K, Miyasho T, Endo Y, Kadosawa T, Iwano H, Uchide T. Serum big endothelin-1 as a clinical marker for cardiopulmonary and neoplastic diseases in dogs. *Life Sci.* 2014; 118: 329–332.
24. Galiè N, Humbert M, Vachiéry JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, Sitbon O, Torbicki A, Delcroix M, Naeije R, Hoeper M, Chaouat A, Morand S, Besse B, Simonneau G; Arterial Pulmonary Hypertension and Beraprost European (ALPHABET) Study Group. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 1496–1502.
25. Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G; Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2148–2157.
26. Galiè N, Barberà JA, Frost AE, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Peacock AJ, Simonneau G, Vachiery JL, Grünig E, Oudiz RJ, Vonk-Noordegraaf A, White RJ, Blair C, Gillies H, Miller KL, Harris JH, Langley J, Rubin LJ; AMBITION Investigators. Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med.* 2015; 373: 834–844.

27. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Noordegraaf AV, Beghetti M, Ghofrani A, Sanchez MAG, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the european society of cardiology (ESC) and the european respiratory society (ERS): endorsed by: association for european paediatric and congenital cardiology (AEPC), international society for heart and lung transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2015; 37: 67–119.
28. Glaus TM, Hässig M, Baumgartner C, Reusch CE. Pulmonary hypertension induced in dogs by hypoxia at different high-altitude levels. *Vet Res Commun*. 2003; 27: 661–670.
29. Goffredo BM, Cairolì S, Vitale A, Corsetti T, Pastore A. Reverse-phase high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in plasma of children. *Biomed Chromatogr*. 2016; 30, 2070–2073.
30. Gough K, Hutchison M, Keene O, Byrom B, Ellis S, Lacey L, McKellar J. Assessment of dose proportionality :report from the statisticians in the pharmaceutical industry / pharmacokinetics UK joint working party. *Drug Inf J*. 1995; 29: 1039–1048.
31. Greiner S, Jud A, Aurich M, Hess A, Hilbel T, Hardt S, Katus HA, Mereles D. Reliability of noninvasive assessment of systolic pulmonary artery pressure by Doppler echocardiography compared to right heart catheterization: analysis in a large patient population. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3: e001103.
32. Guazzi M, Labate V. Group 2 PH: Medical therapy. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016; 59: 71–77.
33. Guazzi M, Naeije R. Pulmonary hypertension in heart failure pathophysiology, pathobiology, and emerging clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 69: 1718–1734.
34. Guglielmini C, Civitella C, Diana A, Di Tommaso M, Cipone M, Luciani A. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with precapillary and postcapillary pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med*. 2010; 24: 145–152.
35. Guilhaire J, Noly PE, Schrepfer S, Mercier O. Advancing knowledge of right ventricular pathophysiology in chronic pressure overload: Insights from experimental studies. *Arch*

- Cardiovasc Dis. 2015; 108: 519–529.
36. Hori Y, Uchide T, Saitoh R, Thoei D, Uchida M, Yoshioka K, Chikazawa S, Hoshi F. Diagnostic utility of NT-proBNP and ANP in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Vet J.* 2012; 194: 215–221.
 37. Hori Y, Kondo C, Matsui M, Yamagishi M, Okano S, Chikazawa S, Kanai K, Hoshi F, Itoh N. Effect of the phosphodiesterase type 5 inhibitor tadalafil on pulmonary hemodynamics in a canine model of pulmonary hypertension. *Vet J.* 2014; 202: 334–339.
 38. Htet H., Aye SN, Aye LM, Aung K. Pharmacokinetic changes in congestive heart failure. *JMSCR.* 2017; 5: 24727–24734.
 39. Hummel J, McKendrick S, Brindley C, French R. Exploratory assessment of dose proportionality: review of current approaches and proposal for a practical criterion. *Pharm Stat.* 2009; 8: 38–49.
 40. Igarashi T, Sekido T. Case studies for statistical analysis of toxicokinetic data. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1996; 23: 193–208.
 41. Johnson L. Diagnosis of pulmonary hypertension. *Clin Tech Small Anim Pract.* 1999; 14: 231–236.
 42. Johnson L, Boon J, Orton EC. Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992–1993. *J Vet Intern Med.* 1999; 13: 440–447.
 43. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985–1995. *J Vet Intern Med.* 1999; 13: 338–345.
 44. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggström J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R, Uechi M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2019; 33: 1127–1140.
 45. Kellihan HB, Stepien RL. Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010; 40: 623–641.
 46. Kellihan HB, Stepien RL. Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease. *J Vet Cardiol.* 2012; 14: 149–164.
 47. Kellihan HB, Waller KR, Pinkos A, Steinberg H, Bates ML. Acute resolution of pulmonary

- alveolar infiltrates in 10 dogs with pulmonary hypertension treated with sildenafil citrate: 2005–2014. *J Vet Cardiol.* 2015; 17: 182–191.
48. Kellum HB, Stepien RL. Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 1258–1264.
 49. Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA, Chiles PG, Morris TA, Channick RN. Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2000; 15: 640–648.
 50. Kuntz M, Leiva-Juarez MM, Luthra S. Systematic review of randomized controlled trials of endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Lung.* 2016; 194: 723–732.
 51. Lainscak M, Vitale C, Seferovic P, Spoletini I, Cvan Trobec K, Rosano GM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cardiovascular drugs in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2016; 224: 191–198.
 52. Lee SK, Kim DH, Yoo HH. Comparative metabolism of sildenafil in liver microsomes of different species by using LC/MS-based multivariate analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879: 3005–3011.
 53. López-Candales A, Rajagopalan N, Saxena N, Gulyasy B, Edelman K, Bazaz R. Right ventricular systolic function is not the sole determinant of tricuspid annular motion. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 973–977.
 54. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J, Harrington RA, Anderson JL, Bates ER, Bridges CR, Eisenberg MJ, Ferrari VA, Grines CL, Hlatky MA, Jacobs AK, Kaul S, Lichtenberg RC, Lindner JR, Moliterno DJ, Mukherjee D, Pohost GM, Rosenson RS, Schofield RS, Shubrooks SJ, Stein JH, Tracy CM, Weitz HH, Wesley DJ; ACCF/AHA. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the american college of cardiology foundation task force on expert consensus documents and the american heart association: developed in collaboration with the american college of chest physicians, american thoracic society, inc., and the pulmonary hypertension

- association. *Circulation*. 2009; 119: 2250–2294.
55. Mondritzki T, Boehme P, Schramm L, Vogel J, Mathar I, Ellinghaus P, Kolkhof P, Bischoff E, Hüser J, Dinh W, Sandner P, Truebel H. New pulmonary hypertension model in conscious dogs to investigate pulmonary-selectivity of acute pharmacological interventions. *Eur J Appl Physiol*. 2018; 118: 195–203.
 56. Morita T, Nakamura K, Osuga T, Morishita K, Sasaki N, Ohta H, Takiguchi M. Right ventricular function and dyssynchrony measured by echocardiography in dogs with precapillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol*. 2019; 23: 1-14.
 57. Murphy LA, Russell N, Bianco D, Nakamura RK. Retrospective evaluation of pimobendan and sildenafil therapy for severe pulmonary hypertension due to lung disease and hypoxia in 28 dogs (2007-2013). *Vet Med Sci*. 2017; 3: 99–106.
 58. Naeije R, Manes A. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev*. 2014; 23: 476–487.
 59. Nakamura K, Yamasaki M, Ohta H, Sasaki N, Murakami M, Bandula Kumara WR, Takiguchi M. Effects of sildenafil citrate on five dogs with Eisenmenger's syndrome. *J Small Anim Pract*. 2011; 52: 595–598.
 60. Nichols DJ, Muirhead GJ, Harness JA. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br J Clin Pharmacol*. 2002; 53: 5S–12S.
 61. Ogawa R, Stachnik JM, Echizen H. Clinical pharmacokinetics of drugs in patients with heart failure: an update (part 2, drugs administered orally). *Clin Pharmacokinet*. 2014; 53: 1083–1114.
 62. O'Leary JM, Assad TR, Xu M, Farber-Eger E, Wells QS, Hemnes AR, Brittain EL. Lack of a tricuspid regurgitation Doppler signal and pulmonary hypertension by Invasive measurement. *J Am Heart Assoc*. 2018; 30: e009362.
 63. Oswald GP, Orton EC. Patent ductus arteriosus and pulmonary hypertension in related Pembroke Welsh corgis. *J Am Vet Med Assoc*. 1993; 202: 761–764.
 64. Pariaut R, Saelinger C, Strickland KN, Beaufrère H, Reynolds CA, Vila J. Tricuspid annular

- plane systolic excursion (TAPSE) in dogs: reference values and impact of pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 2012; 26: 1148–1154.
65. Plumb DC. Sildenafil citrate. In: *Veterinary drug handbook*. 9th ed. Wiley-Blackwell. 2018; 1069–1070.
 66. Poser H, Berlanda M, Monacoli M, Contiero B, Coltro A, Guglielmini C. Tricuspid annular plane systolic excursion in dogs with myxomatous mitral valve disease with and without pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* 2017; 19: 228–239.
 67. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Biondo AW, Solter PF. Plasma endothelin-1 immunoreactivity in normal dogs and dogs with acquired heart disease. *J Vet Intern Med.* 2004; 18: 840–844.
 68. Pyle RL, Abbott J, MacLean H. Pulmonary hypertension and cardiovascular sequelae in 54 dogs. *Int J Appl Res Vet Med.* 2004; 2: 99.
 69. Ramu B, Thenappan T. Evolving concepts of pulmonary hypertension secondary to left heart disease. *Curr Heart Fail Rep.* 2016; 13: 92–102.
 70. Ray L, Mathieu M, Jespers P, Hadad I, Mahmoudabady M, Pensis A, Motte S, Peters IR, Naeije R, McEntee K. Early increase in pulmonary vascular reactivity with overexpression of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in canine experimental heart failure. *Exp Physiol.* 2008; 93: 434–442.
 71. Rosenkranz S, Preston IR. Right heart catheterisation: best practice and pitfalls in pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev.* 2015; 24: 642–652.
 72. Rosenkranz S, Gibbs JSR, Wachter R, De Marco T, Vonk-Noordegraaf A, Vachiéry JL. Left ventricular heart failure and pulmonary hypertension. *Eur Heart J.* 2016; 37: 942–954.
 73. Rothman A, Wiencek RG, Davidson S, Evans WN, Restrepo H, Sarukhanov V, Mann D. Challenges in the development of chronic pulmonary hypertension models in large animals. *Pulm Circ.* 2017; 7: 156–166.
 74. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the american society of echocardiography endorsed by the european

- association of echocardiography, a registered branch of the european society of cardiology, and the canadian society of echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010; 23: 685–713.
75. Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, Herr JE, Johri AM, Archer SL. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol.* 2015; 31: 391–406.
 76. Sasaki Y, Kitagawa H, Hirano Y. Relationship between pulmonary arterial pressure and lesions in the pulmonary arteries and parenchyma, and cardiac valves in canine dirofilariasis. *J Vet Med Sci.* 1992; 54: 739–744.
 77. Satoh T, Saji T, Watanabe H, Ogawa S, Takehara K, Tanabe N, Yamada N, Yao A, Miyaji K, Nakanishi N, Suzuki Y, Fujiwara T, Kuriyama T. A phase III, multicenter, collaborative, open-label clinical trial of sildenafil in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2011; 75 : 677–682.
 78. Schober KE, Baade H. Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland white terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med.* 2006; 20: 912–920.
 79. Serres F, Chetboul V, Tissier R, Sampedrano CC, Gouni V, Nicolle AP, Pouchelon JL. Doppler echocardiography-derived evidence of pulmonary arterial hypertension in dogs with degenerative mitral valve disease: 86 cases (2001–2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2006; 229: 1772–1778.
 80. Serres F, Nicolle AP, Tissier R, Gouni V, Pouchelon JL, Chetboul V. Efficacy of oral tadalafil, a new long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor, for the short-term treatment of pulmonary arterial hypertension in a dog. *J Vet Med A.* 2006; 53: 129–133.
 81. Serres F, Chetboul V, Gouni V, Tissier R, Sampedrano CC, Pouchelon JL. Diagnostic value of echo-Doppler and tissue Doppler imaging in dogs with pulmonary arterial hypertension. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 1280–1289.
 82. Sheu MT, Wu AB, Yeh GC, Hsia A, Ho HO. Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 791: 255–262.

83. Souza-Silva AR, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, Moreno H Jr, Evora PR, Tanus-Santos JE. Hemodynamic effects of combined sildenafil and L-arginine during acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2005; 524: 126–131.
84. Soydan LC, Kelliham HB, Bates ML, Stepien RL, Consigny DW, Bellofiore A, Francois CJ, Chesler NC. Accuracy of Doppler echocardiographic estimates of pulmonary artery pressures in a canine model of pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* 2015; 17: 13–24.
85. Stepien RL. Pulmonary arterial hypertension secondary to chronic left-sided cardiac dysfunction in dogs. *J Small Anim Pract.* 2009; 50: 34–43.
86. Suarez MA, Dziki BT, Stegmann FG, Hartman M. Comparison of alfaxalone and propofol administered as total intravenous anaesthesia for ovariohysterectomy in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2012; 39: 236–244.
87. Sudunagunta S, Green D, Christley R, Dukes-McEwan J. The prevalence of pulmonary hypertension in Cavalier King Charles spaniels compared with other breeds with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Cardiol.* 2019; 23: 21–31.
88. Suzuki S, Fukushima R, Ishikawa T, Hamabe L, Aytemiz D, Huai-Che H, Nakao S, Machida N, Tanaka R. The effect of pimobendan on left atrial pressure in dogs with mitral valve regurgitation. *J Vet Intern Med.* 2011; 25: 1328–1333.
89. Tai TC, Huang HP. Echocardiographic assessment of right heart indices in dogs with elevated pulmonary artery pressure associated with chronic respiratory disorders, heartworm disease, and chronic degenerative mitral valvular disease. *Vet Med.* 2013; 58: 613–620.
90. Tessier-Vetzel D, Tissier R, Chetboul V, Carlos C, Nicolle A, Benbaron D, Dandrieux J, Thoulon F, Carayon A, Pouchelon JL. Diagnostic and prognostic value of endothelin-1 plasma concentrations in dogs with heart and respiratory disorders. *Vet Rec.* 2006; 158: 783–788.
91. Tidholm A, Höglund K, Häggström J, Ljungvall I. Diagnostic value of selected echocardiographic variables to identify pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2015; 29: 1510–1517.
92. Toyoshima Y, Kanemoto I, Arai S, Toyoshima H. A case of long-term sildenafil therapy in a young dog with pulmonary hypertension. *J Vet Med Sci.* 2007; 69: 1073–1075.

93. Ueda Y, Johnson LR, Ontiveros ES, Visser LC, Gunther-Harrington CT, Stern JA. Effect of a phosphodiesterase-5A (PDE5A) gene polymorphism on response to sildenafil therapy in canine pulmonary hypertension. *Sci Rep.* 2019; 3: 6899.
94. Vachiéry JL, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galiè N, Ghio S, Gibbs JSR, Martinex F, Semigran M, Simonneau G, Wells A, Seeger W. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62: 100–108.
95. Venco L, Mihaylova L, Boon JA. Right pulmonary artery distensibility Index (RPAD Index). A field study of an echocardiographic method to detect early development of pulmonary hypertension and its severity even in the absence of regurgitant jets for Doppler evaluation in heartworm-infected dogs. *Vet Parasitol.* 2014; 206: 60–66.
96. Visser LC, Scansen BA, Schober KE, Bonagura JD. Echocardiographic assessment of right ventricular systolic function in conscious healthy dogs: repeatability and reference intervals. *J Vet Cardiol.* 2015; 17: 83–96.
97. Visser LC, Scansen BA, Brown NV, Schober KE, Bonagura JD. Echocardiographic assessment of right ventricular systolic function in conscious healthy dogs following a single dose of pimobendan versus atenolol. *J Vet Cardiol.* 2015; 17: 161–172.
98. Visser LC, Im MK, Johnson LR, Stern JA. Diagnostic value of right pulmonary artery distensibility index in dogs with pulmonary hypertension: comparison with Doppler echocardiographic estimates of pulmonary arterial pressure. *J Vet Intern Med.* 2016; 30: 543–552.
99. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, Torbicki A, Voelkel NF, Hassoun PM. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62: 22–33.
100. Vonk Noordegraaf A, Westerhof BE, Westerhof N. The relationship between the right ventricle and its load in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69: 236–243.
101. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.*

1999; 29: 297–310.

102. Walker LA, Buttrick PM. The right ventricle: biologic insights and response to disease: updated. *Curr Cardiol Rev.* 2013; 9: 73–81.

103. Yock PG, Popp RL. Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation. *Circulation.* 1984; 70: 657–662.

謝辞

本論文を終えるにあたり、終始多大なるご指導ご鞭撻を賜った本学獣医内科学研究室第二の竹村直行 教授および宮川優一 講師、そして本学生体分子化学研究室の田崎弘之 教授および佐藤稲子 講師に心より感謝申し上げます。

また、本研究を行うに際しご尽力頂いた本学獣医内科学研究室第二大学院生の酒谷篤先生、小川実月 先生、長川雅佳 先生、宮川寛済 先生、本学獣医内科学研究室第二卒業生の河原咲 先生、今田舞 先生、進藤凧沙 先生、高谷渉 先生、中澤可奈 先生、中村文香 先生、中村理紗 先生、鍋島健太郎 先生、一箭紗和子 先生、島野翔太郎 先生、原田このみ 先生、矢野健人 先生、渡邊陸 先生、本学獣医内科学研究室第二室員の石坂美緒さん、加藤安美さん、川村彩乃さん、後藤絵里さん、後藤智紗子さん、澤崎まゆりさん、塩住友哉さん、長谷由貴さん、上野詩音さん、大木遥さん、山脇日向さん、吉田将汰さん、大垣晴愛さん、大森美穂さん、嘉生紗蘭ファティムさん、小島有希さん、高澤歩美さん、青山祐子さん、片桐啓輔さん、櫻林空良さん、重信あみさん、野原はづきさん、長谷川由比さん、畠山真悠子さん、平田和樹さんに厚く御礼申し上げます。

そして、本学に入学以来、多大な迷惑をかけ続けたにもかかわらず支え続けてくれた両親に心から感謝します。

最後に、本研究に供試した実験動物たち(アズキ、コウシ、シオン、シナコ、ズンダ、マルコ、ミサコ、ライト)に深く感謝するとともに、この研究成果および今後なされていくであろう多くの研究成果が、疾患に罹患した動物たちの苦痛を少しでも和らげるのに役立つことを願います。