

イヌでの血漿 N 末端プロ心房性  
ナトリウム利尿ペプチド濃度の  
臨床的意義に関する研究

(Studies on the clinical significance of  
N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in dogs)

小川実月

イヌでの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム  
利尿ペプチド濃度の臨床的意義に関する研究  
(Studies on the clinical significance of  
N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in dogs)

小川実月

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 30 年入学

(指導教授: 竹村直行)

令和 4 年 3 月

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する食事の影響および日内変動に関する検討	7
2.1	緒言	8
2.2	材料および方法	9
2.3	結果	12
2.4	考察	16
2.5	小括	19
第 3 章	イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチドおよび N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する水和状態の影響に関する検討	20
3.1	緒言	21
3.2	材料および方法	21
3.3	結果	24
3.4	考察	30
3.5	小括	32
第 4 章	イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する糸球体濾過量の影響	33
4.1	緒言	34
4.2	材料および方法	35
4.3	結果	38
4.4	考察	46
4.5	小括	49
第 5 章	粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌでの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度および 3 種類の心臓バイオマーカーの病態に対する識別能の比較	50
5.1	緒言	51
5.2	材料および方法	52
5.3	結果	56
5.4	考察	66
5.5	小括	69

第6章 うっ血性心不全徴候を呈さない粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌ および呼吸器疾患のイヌにおける発咳の原因鑑別ツールとしての 心臓バイオマーカーの有用性	70
6.1 緒言	71
6.2 材料および方法	72
6.3 結果	75
6.4 考察	80
6.5 小括	82
第7章 総括	83
参考文献	91
謝辞	106

# 第 1 章

## 序論

イヌでは、粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD)は最も一般的な後天性心疾患である[12,18]. 特に、小型犬では加齢と共に MMVD の有病率は著しく上昇することが知られており、13 歳までに 85 %の小型犬で僧帽弁に粘液腫様変性が認められる[16]. MMVD は不可逆的に進行する.MMVD に罹患したイヌでは、心拡大に伴い気道が圧迫されることで、発咳を生じることがある[33,38]. また、MMVD が進行したイヌでは、心拍出量の減少に伴う運動不耐性、そして左房内圧の上昇に伴う肺静脈圧の上昇、かつ肺間質液の回収能の低下による心原性肺水腫といった心不全徴候が認められる[44]. これらの臨床徴候は、いずれもイヌの生活の質を障害する. そのため、MMVD の治療目標は、病態の進行を遅らせること、そして臨床徴候を緩和させることであり、可能な限り早期の段階でMMVD を検出し、必要に応じて治療することが重要である.

アメリカ獣医内科学会 (ACVIM)の MMVD に関するガイドラインでは、進行の程度によってMMVD をステージ A, B1, B2, C および D に分類している[55]. MMVD の発症リスクは高いが、現在心臓に器質的異常がないイヌはステージ A に分類される. そして、うっ血性心不全徴候がない MMVD に罹患したイヌはステージ B に分類され、左心拡大の有無でステージ B1 および B2 に細分類される. うっ血性心不全徴候を示すイヌは、ステージ C または D に分類される. 過去または現在に問診、身体診察および画像検査の結果から、うっ血性心不全と診断されたイヌはステージ C に、そして標準的な治療に難治性を示す末期心不全のイヌはステージ D に分類される. これらのステージのうち、ステージ B2 以降では、臨床徴候の有無に関わらず、薬物治療の開始が推奨されている[14]. 左心拡大の判断には、胸部 X 線検査および心エコー図検査が用いられる. しかし、これらの画像検査は正確なデータの取得に手技の訓練および専門知識を必要とする. いっぽう、MMVD の検出に利用されている心臓バイオマーカー (CB)検査は測定に特別な訓練を必要としない簡易的な検査である.

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)は、イヌで一般的に用いられてきたCBであり、同時にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の抑制作用、ナトリウム利尿作用および血管拡張作用を有する生理活性物質である[42,45,67,108]. 血中 ANP 濃度は、心疾患に罹患したイヌの左房サイズと有意に相関することが報告されている[58]. そのため、ANP は MMVD の診断の補助的検査として用いられてきた. しかし、現在 MMVD のイヌで世界的に最も広く用いられている CB は、血漿 ANP 濃度ではなく血漿 N 末端

プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)濃度である[27,97]. 血漿 NT-proBNP 濃度は心室で合成される非生理活性物質であり, 心室筋の伸展に伴い上昇する[30,68]. CBとして血漿NT-proBNP 濃度が血漿ANP 濃度よりも活用されている理由として, 半減期の違いが挙げられる. ANP は血中に分泌された後, クリアランス受容体と結合し, エンドペプチダーゼによる加水分解を経て速やかに血中から消失する[102]. そのため, ANP の半減期は1-5分と短い[102,107]. これに対し, NT-proBNP は, クリアランス受容体に取り込まれることがないため, 半減期が120分と血中に存在する時間がANPよりも長い[69].

N末端プロANP (NT-proANP)は, ANPと同様に心房筋の伸展刺激に伴い血中に放出される非生理活性物質である[120]. ANPは, 主に心房筋の分泌顆粒内にアミノ酸から構成されるプロホルモンのC末端部分 (proANP<sub>1-126</sub>)として貯蔵されており, 心房筋の伸展刺激, 特に容量負荷によって血中に放出される (図1-1)[102]. 血中放出時に proANP<sub>1-126</sub>はセリンプロテアーゼの1種であるコリンによって生理活性体である28個のアミノ酸により構成されるANP, そして98個のアミノ酸により構成されるNT-proANPに分解される[25]. NT-proANPは, 1-30, 31-67および68-98というアミノ酸から構成される3つのフラグメントに切断される. これらのフラグメントはANPとは異なり, クリアランス受容体と結合しないため, 半減期がANPの約10倍と長いことが報告されている[3,115,123,125]. なお, 本研究では, NT-proANPおよび上述した3種類のフラグメントを全てNT-proANPと呼称する.

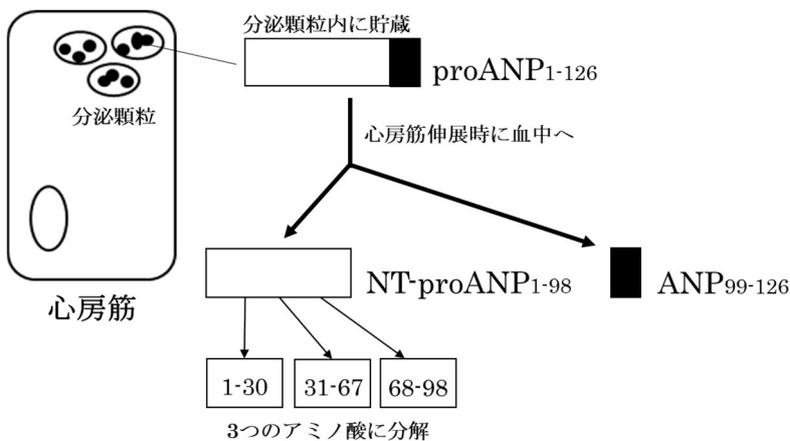


図1-1. NT-proANPの生合成機序

NT-proANP, N末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド.

NT-proANP も NT-proBNP と同様に血中での安定性に優れていることから、血漿 NT-proANP 濃度の CB としての有用性は血漿 NT-proBNP 濃度に劣らないと考えられる。実際に過去のイヌの報告では、血漿 NT-proANP 濃度によるうっ血性心不全の識別能は、血漿 NT-proBNP 濃度のそれに劣らず、高いことが報告されている（血漿 NT-proANP 濃度, 感度 95.5 % および特異度 84.6 %; 血漿 NT-proBNP 濃度, 感度 83.2 % および特異度 90.0 %)[95]。うっ血性心不全徴候を伴わない MMVD に罹患したキャバリア・キング・チャールズ・スパニエルの報告では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度による重度な僧帽弁逆流の識別能は同等であった[112]。しかし、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度によるうっ血性心不全の識別能を MMVD 以外の心疾患に罹患したイヌも含めて比較した報告では、血漿 NT-proBNP 濃度は血漿 NT-proANP 濃度よりも優れていたと結論付けている[13]。イヌで血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の識別能を比較した研究は現在この 2 報のみであり、MMVD の診断および病態の推定に対する血漿 NT-proANP 濃度の有用性に関しては、不明な点が非常に多い。

ANP および BNP では、それぞれ分泌様式が異なる。ANP は心房筋の分泌顆粒内に貯蔵されているため、心房筋の進展に伴い速やかに分泌される[62,94]。いっぽう、BNP は ANP よりも分泌顆粒内に貯蔵されている量が少ないため、ANP と比較して速やかには分泌されない[94,114]。そのため、血漿 NT-proANP 濃度は血漿 NT-proBNP 濃度と比較して、MMVD のより早期のステージから上昇する可能性がある。しかし、現在までに報告されているイヌでの血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の病態に対する識別能の調査は、うっ血性心不全を伴う症例のみを対象にしている[13,87,95,112]。

また、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度に関する研究は、血漿 NT-proBNP 濃度と比較して明らかに不足している。イヌでは、血漿 NT-proBNP 濃度は週内変動を示し、腎機能などの影響を受けることが明らかにされている[57,75]。しかし、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度に影響する心臓以外の要因に関する調査はほとんど実施されていない。これらの検討は、CB としての血漿 NT-proANP 濃度の有用性を高める可能性がある。また、血漿 NT-proANP 濃度が血漿 NT-proBNP 濃度と異なる心臓以外の要因の影響を受ける場合、これらの CB を活用する上で差別化が図れるかもしれない。

ラットでは食事の影響を受けて血漿 NT-proANP 濃度が変化すること[85]、そしてラットおよびヒトでは、血漿 ANP および NT-proANP 濃度の日内変動が報告されている

[85,98,99]. イヌでは、血漿 NT-proANP 濃度の日内変動に関する報告はないが、左房内圧に日内変動が存在することが報告されている[48]. 血漿 NT-proANP 濃度は左房圧の上昇およびそれに伴う心房筋の伸展によって上昇することから、イヌでも血漿 NT-proANP 濃度には日内変動が存在する可能性がある. この CB の日内変動の評価は、イヌで血漿 NT-proANP 濃度を測定する上で適正な採血タイミングを設定し、CB としての臨床的価値をより高めるために重要であると考えられる.

イヌでは、血漿 ANP 濃度は脱水時に減少することが報告されている[121]. これは ANP のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の抑制作用、ナトリウム利尿作用および血管拡張作用と関連している[26,110]. NT-proANP は ANP と等モルの分子量で血中へ放出されることから、血漿 NT-proANP 濃度も脱水の影響を受けるかもしれない[120]. ヒトでは、血漿 ANP 濃度は体液量を反映することから、心疾患の診断だけではなく、血液透析患者では体液量の指標としても用いられている[22]. イヌでは血液透析後の体液量の指標として CB を用いた研究は存在しない. イヌでも血漿 NT-proANP 濃度が体液量を反映するのであれば、血漿 NT-proANP 濃度は MMVD の診断補助だけでなく、ヒトと同様に動物でも血液透析前後の体液量の指標として活用できる可能性がある. しかし、血液透析に関連した有用性を検討するのであれば、血漿 NT-proANP 濃度が腎機能の影響を受けるかどうかを調査しなければならない. ヒトでは、血中に放出された NT-proANP の 17%が腎臓から排泄される[104]. 重症心不全のヒトでは、糸球体濾過量の低下が血漿 NT-proANP 濃度の上昇に関与することが明らかにされている[101]. 心不全のイヌでは、心拍出量の低下が直接的に糸球体濾過量を低下させ、高窒素血症を引き起こす[79]. そのため、MMVD のイヌでも血漿 NT-proANP 濃度は糸球体濾過量の影響を受けるかもしれない. 以上のことから、血漿 NT-proANP 濃度の食事の摂取、日内変動および脱水の影響、そして腎機能との関連性を明らかにした上で、MMVD のイヌでの CB の有用性を他の CB と比較・検討すべきである.

また、MMVD のイヌでは心拡大に伴う気道の圧迫によって発咳が一般的に認められるが、発咳という臨床徴候は心拡大がそれほど重度でない MMVD のイヌでもしばしば認められる[38]. 臨床現場では、MMVD のイヌに認められる発咳の原因が、気管虚脱などの呼吸器疾患なのか、MMVD なのかを鑑別することが困難な場合が少なくない. 血漿 NT-proANP 濃度が血漿 NT-proBNP 濃度よりも MMVD の早期のステージで上昇する

とすれば、血漿 NT-proANP 濃度は早期のステージでの MMVD による発咳および呼吸器疾患における発咳の原因鑑別にも役立つ可能性がある。

以上のことから、本研究の第2章では、臨床的に健康なイヌを用いて血漿 NT-proANP 濃度に対する食事の影響、そして日内変動の有無を調査した。続いて第3章では、健康なイヌでの血漿 NT-proANP 濃度に対する脱水の影響を評価し、第4章では血漿イオヘキソール・クリアランス試験により糸球体濾過量を測定したイヌを対象に、血漿 NT-proANP 濃度に対する糸球体濾過量の影響を評価した。そして第5章では、MMVD のイヌにおける血漿 NT-proANP 濃度の CB としての有用性を検討し、最後に第6章では発咳を示すイヌでの血漿 NT-pro ANP 濃度の MMVD および呼吸器疾患の原因鑑別能を調査することで、血漿 NT-proANP 濃度の臨床的意義を検討した。なお、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の血中濃度の上昇要因の違いを明らかにし、両者の CB としての特徴を比較、そして臨床現場での使用を検討するために、第3, 5 および 6 章では血漿 NT-proBNP 濃度も血漿 NT-proANP 濃度と併せて調査した。

## 第2章

イヌの血漿 N 末端プロ心房性  
ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する  
食事の影響および日内変動に関する検討

## 2.1 緒言

N末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proANP)は、心房筋の伸展刺激に伴い血中へ放出される非生理活性物質であり[102,120]、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度は、心疾患の進行に伴い上昇することが報告されている[95,112]。しかし、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度が心疾患以外の要因で上昇するか否かは調査されていない。血漿 NT-proANP 濃度が心疾患以外の理由で上昇するのであれば、心疾患のイヌでは血漿 NT-proANP 濃度の結果の解釈に注意する必要がある。

ヒトおよびラットでは、血漿 ANP および NT-proANP 濃度には日内変動が存在することが報告されている[85,98,99]。ラットの過去の報告では、夕方から明朝にかけて血漿 NT-proANP 濃度は高値を示した[85]。この理由として、飲水量の増加が関係していると考えられている。イヌは、ラットと異なり夜行性動物ではないため、飲水量が夜間に増加することはないが、イヌでも食後に飲水量が増加することで血漿 NT-proANP 濃度は上昇するかもしれない。加えて、イヌでは左房圧は興奮時に上昇し、夜間に低下することが報告されている[48]。血漿 NT-proANP 濃度の上昇には、左房圧も関係していることから、血漿 NT-proANP 濃度には食事に関係なく日内変動が存在する可能性がある。

イヌでは自律神経機能の指標である心拍数および心拍変動 (HRV)に日内変動が存在すること、そしてヒトおよびイヌでは心拍数が血漿 ANP 濃度に影響することが報告されている[72,86,122,119]。加えてヒトでは、HRV も血漿 ANP 濃度に影響することが明らかにされている[54]。また、ヒトでは ANP は降圧作用を有するが、この作用に伴う反射性頻脈はほぼ示さないことから、交感神経抑制作用も有していると考えられている[46]。NT-proANP は ANP と等モル量で血中に放出されることから[102]、イヌでは、心拍数および HRV の変化は間接的に血漿 NT-proANP 濃度の日内変動に影響を与えるかもしれない。

したがって、本章の目的は、血漿 NT-proANP 濃度に対する食事の影響および日内変動を評価することとした。また、血漿 NT-proANP 濃度に日内変動が認められた場合、この変動に自律神経機能が関与しているか否かかも併せて調査した。

## 2.2 材料および方法

### 供試動物

本章の実験は、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ビーグル犬 5 頭 (年齢: 1.8–6.6 歳, 体重: 12.1–14.0 kg, 未去勢雄: 4 頭, 避妊雌: 1 頭) を用いた。全てのイヌが臨床的に健康であることを確認するために、身体診察, 血液検査, 尿検査, 血圧検査, 心電図検査, 胸部 X 線検査および心エコー図検査を実施した。イヌは採血時を除き, ステンレス製ケージ内で個別に管理され, 実験期間中は常に自由飲水とした。本章の実験は, 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施した (承認番号 2019S-50)。

### 実験 1: 食事摂取の影響に関する調査

実験 1 では, フード給与 5 分前をベースライン (BL) とし, イヌにフードを給与し, 完食してから 5, 15, 30 分, そして 1 および 2 時間後に採血した。また, 実験期間中は食後の飲水タイミングをモニタリングした。フードには市販されている維持食のドライフード (Hill's サイエンスダイエットアダルト, 日本ヒルズ・コルゲート株式会社, 東京) を使用した。

#### 1) 評価項目

BL および上述した食後の採血時刻に得られた血漿を用いて血漿 NT-proANP 濃度を測定した。

#### 2) 血漿 NT-proANP 濃度の測定方法

事前に橈側皮静脈に設置した留置 (23 G) から 2 mL の血液を採取し, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-2K (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 福島) に分注した。分注後, 3000 rpm 5 分間で遠心分離し (採血後 1 時間以内に実施), 得られた血漿検体は測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し, 外部検査機関 (共立製薬株式会社, 東京) に測定を委託した。なお, 本章では留置から採血するにあたり, ヘパリン加生理食塩水の混入による希釈を防ぐため, 留置から 1 mL 採血した後に検体用の採血を実施した。

血漿 NT-proANP 濃度は, 2 種類のモノクローナル抗体 (KS1-6 およびビオチン化

KS2-2)を用いたサンドイッチ酵素結合免疫吸着法 (ELISA)で測定した。そして、検出試薬にはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを標識酵素としたストレプトアビジンを使用した。抗体は、NT-proANP と同一の光学濃度を示し、モル換算で同一の親和性を有する NT-proANP の断片化したフラグメントの1つである proANP31-67 を標的とした。proANP31-67 に対する抗体はマウスから生成したが、イヌの proANP31-67 とマウスから生成した抗体の交差性は確認された。以上のことから、測定した proANP31-67 の値に NT-proANP の分子量 (10466)を proANP31-67 の分子量 (3815)で除した値、つまり 2.743 を乗じることで血漿 NT-proANP 濃度を算出した。

Inter-assay は、3 種類のサンプルを使用し、各サンプルを 4 種類の濃度 (0, 200, 1200 および 2000 pg/mL)に調製してそれぞれ 3 回測定することで確認した。変動係数 (CV) の中央値 (範囲)は 5.0 (1.7-10.7) %であった。Intra-assay は、測定日、操作者および使用機器を変更した上で、Inter-assay と同様に計 3 回測定を実施することで確認した。その結果、CV は 10.1 (3.7-18.2) %であった。

血漿 NT-proANP 濃度の検出限界の下限値は 110 pg/mL であった。血漿 NT-proANP 濃度の測定上限値は 2000 pg/mL とし、この値を超えた場合は、血漿を 1 %-ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝食塩水で 1/4-1/512 に希釈し、測定値 (平均値)に各連続希釈液の希釈倍率  $n$  を乗じた値をその検体の血漿濃度とした。また、1/8, 1/16, 1/32 および 1/64 の各希釈検体の CV を計 14 検体用いて検証したところ、CV の中央値 (範囲)は 8.0 (5.0-12.3) %であった。したがって、希釈測定は妥当であると判断した。

## 実験 2: 日内変動の評価

実験 2 では、供試動物から 10:30, 13:30, 16:30, 19:30, 22:30, そして翌日の 1:30, 4:30 および 7:30 に採血した。食事は 8:00 および 19:00 に統一し、フードには実験 1 と同じものを使用した。また、実験 2 では自律神経機能を定量化するため、全てのイヌにホルター心電計を装着し、心拍数および HRV を測定した。照明時間については、明期は 7:00 から 22:00, そして暗期は 22:00 から翌日の 7:00 に統一した。実験期間中は全てのイヌの飲水タイミングおよび睡眠タイミングをモニタリングした。

## 1) 評価項目

評価項目は、血漿 NT-proANP 濃度、心拍数および HRV (全 RR 間隔の標準偏差 [SDNN], 連続して隣接する RR 間隔の差の二乗の平均値の平方根 [RMSSD], そして連続した隣接した RR 間隔の全ての個数に占める差が 50msec を超える心拍の割合 [pNN50])とした。

## 2) 血漿 NT-proANP 濃度の測定方法

実験 1 と同様の手順で実施した。

## 3)ホルター心電図検査

ホルター心電図計測は、長時間心電図記録装置 (デジタルクイックコーダ QR2500: フクダ エム・イー株式会社, 東京)を使用した。ホルター専用ジャケットは順化のため、実験開始の 1 週間前から全てのイヌに装着した。心電計の電極設置部を剃毛し、胸骨柄-剣状突起間 (CH1 誘導)および第 5 肋骨軟骨接合部間 (CH2 誘導)に電極を設置した。2 種類の誘導のうち、ノイズの混入が少ない誘導から得られた心電図波形を解析に使用した。

## 4) 心拍数および HRV 解析

心拍数の解析は、長時間心電図記録解析装置 (HS1000 システム: フクダ エム・イー株式会社, 東京)を、そして HRV の解析 (本章では時間領域解析を採用[60])は専用のソフトウェア (Kubios HRV Premium: Kubios Oy, Finland)を用いて実施した[113]。

なお、実験 2 では採血の影響を考慮し、採血前に得られた 20 分間の心電図データを用いた。そしてこの 20 分間のデータから、変動が少なく、安定した 5 分間を抽出して解析した。心拍数および HRV 解析に関しては、ヒトの HRV 解析ガイドラインを参考にした [1]。

## 統計学的解析

全ての統計解析には、市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24 (日本 IBM 株式会社, 日本)を用いた。各変数に対する正規性の評価には Shapiro-Wilk 検定を用いた。実験 1 では BL および食後の血漿 NT-proANP 濃度を比較するために、Mann-Whitney の

検定を用いた。実験 2 では、各変数を採血タイミング間で比較するために、Mann-Whitney 検定および Bonferroni 補正を用いた。また、実験 2 では Spearman の順位相関係数を用いて、血漿 NT-proANP と心拍数および HRV の関連性を調査した。P<0.05 を統計学的に有意と判断した。

## 2.3 結果

### 実験 1

5 頭中 3 頭のイヌ (個体 1, 4 および 5) では、食後すぐに飲水が認められ、残り 2 頭のイヌ (個体 2 および 3) では食事した 4-5 分後に飲水が確認された。それ以降で飲水が認められたイヌは 1 頭のみであった。

各採血時刻の血漿 NT-proANP 濃度を図 2-1 に示す。血漿 NT-proANP 濃度は、いずれの時間も BL と比較して有意差を示さなかった。

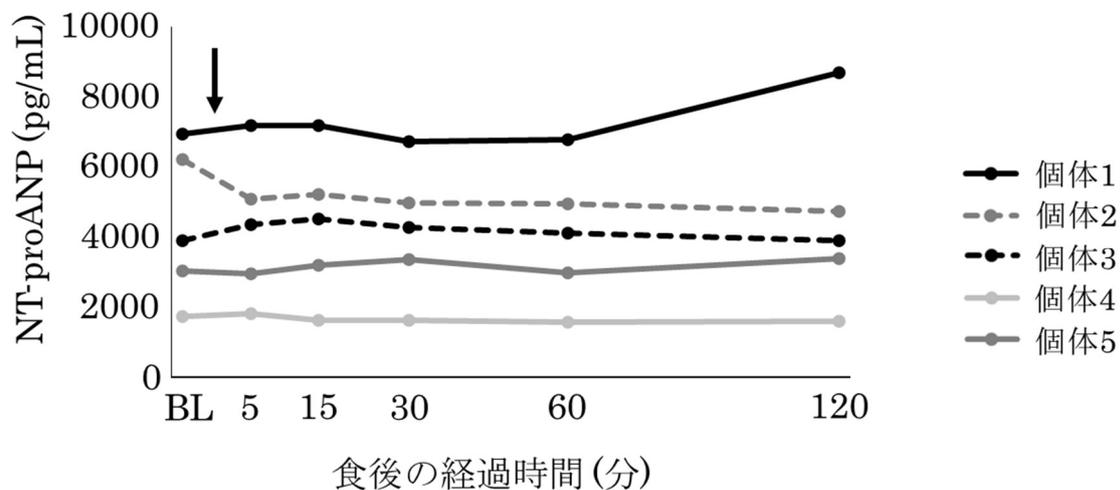


図 2-1. 食後前後の血漿 NT-proANP 濃度

矢印, 食事タイミング; BL (ベースライン), 食事の 5 分前. NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド.

## 実験 2

実験期間中、全てのイヌで飲水が最も多く認められたのは食後の 30 分間以内であった。また、22:30 から翌日の 6:00 には全てのイヌが睡眠状態にあった。5 頭中 3 頭 (個体 1, 2 および 5) は 13:00 から 15:00 の間にも睡眠している様子が確認された。

各採血時刻の血漿 NT-proANP 濃度、心拍数および HRV の結果を表 2-1 に示す。血漿 NT-proANP 濃度では、各採血時刻間で有意差は認められなかった。しかし、5 頭中 4 頭 (個体 2 以外) では、19:30 に一過性の上昇が認められ、全頭で 22:30 から翌日 7:30 にかけて減少傾向を示した (図 2-2A)。心拍数は、各採血時刻間で有意差を示さなかったが、全頭で 16:30 と比較して 19:30 では増加していた (図 2-2B)。22:30 から翌日の 4:30 の間では、心拍数は個体毎で異なる結果を示した。SDNN は 13:30 に 10:30 と比較して有意に増加し ( $P<0.05$ )、16:30 には 13:30 と比較して更に増加していた ( $P<0.05$ )。また、翌日の 4:30 には、SDNN は 10:30 および翌日の 1:30 と比較して有意な増加を示した ( $P<0.05$ ; 図 2-2C)。RMSSD は各採血時刻間で有意差を示さなかったが、全頭が 10:30 から 16:30 にかけて増加し、個体 2 以外のイヌで 19:30 に一過性の低下、そして 22:30 から翌日の 4:30 にかけて増加傾向を示した (図 2-2D)。pNN50 は、各採血時刻間で有意差を示さず、19:30 には 5 頭中 4 頭 (個体 2 以外) で低下傾向を示したものの、特に時刻毎での傾向は確認できなかった (図 2-2E)。

血漿 NT-proANP 濃度と各変数の相関性を図 2-3 に示す。血漿 NT-proANP と RMSSD のみが有意に逆相関したが ( $P<0.05$ ,  $r=-0.336$ ; 図 2-3C)、相関性にはばらつきが認められた。心拍数 ( $P=0.05$ ,  $r=0.296$ ; 図 2-3A)、SDNN ( $P=0.184$ ,  $r=-0.205$ ; 図 2-3B) および pNN50 ( $P=0.30$ ,  $r=-0.168$ ; 図 2-3D) は血漿 NT-proANP 濃度との間に有意な相関を示さなかった。

表2-1. 各採血時刻の血漿NT-proANP濃度、心拍数およびHRVの結果

	10:30	13:30	16:30	19:30	22:30	1:30	4:30	7:30
NT-proANP (pg/mL)	3559 (1595-6356)	2995 (1565-7171)	3684 (1508-6115)	4117 (1745-7432)	2752 (1315-6801)	2470 (1338-5949)	2017 (1315-4730)	1940 (1315-4211)
心拍数 (bpm)	112.09 (86.25-171.34)	84.77 (75.57-93.02)	72.74 (70.40-85.75)	95.37 (69.31-117.67)	88.64 (68.91-109.65)	73.49 (71.63-96.59)	72.30 (55.78-87.38)	80.83 (52.72-88.22)
SDNN (ms)	102.42 (50.53-155.49)	163.74 <sup>a</sup> (150.65-219.30)	221.91 <sup>b</sup> (185.02-282.38)	135.57 (68.65-182.98)	177.88 (140.75-250.71)	224.53 (169.34-275.10)	260.60 <sup>a,c</sup> (200.15-336.93)	197.53 (116.42-395.53)
RMSSD (ms)	106.09 (28.82-156.17)	181.50 (150.44-195.80)	242.65 (182.60-298.43)	121.20 (59.83-220.69)	158.71 (119.59-281.08)	274.88 (155.40-306.37)	295.28 (170.33-401.64)	180.96 (136.92-480.67)
pNN50 (%)	48.03 (7.71-75.58)	71.12 (64.10-75.17)	75.06 (70.32-83.76)	60.08 (30.61-87.53)	73.52 (55.21-94.00)	72.16 (63.90-87.77)	86.42 (63.53-89.56)	75.68 (70.72-91.34)

データは中央値 (最小-最大)で示す。NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; HRV, 心拍変動; SDNN, 全RR 間隔の標準偏差; RMSSD, 連続して隣接する RR 間隔の差の二乗の平均値の平方根; pNN50, 連続した隣接した RR 間隔の全ての個数に占める差が 50msec を超える心拍の割合; a, P<0.05 vs 10:30; b, P<0.05 vs 13:30; c, P<0.05 vs 1:30.

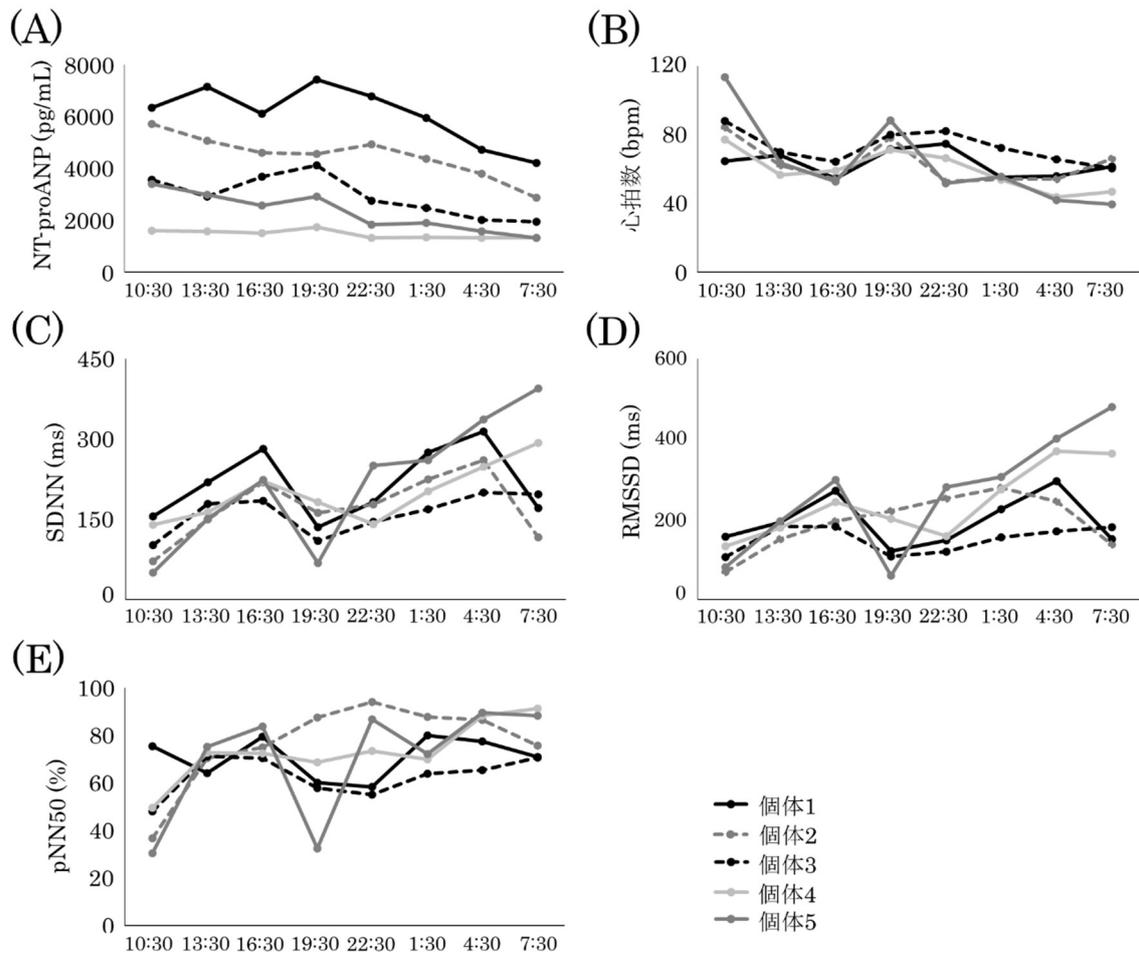


図 2-2. 血漿 NT-proANP 濃度, 心拍数および HRV の経時的変化

時刻は全て採血時間を示す. A, 血漿 NT-proANP 濃度; B, 心拍数; C, SDNN; D, RMSSD; E, pNN50. NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; HRV, 心拍変動; SDNN, 全 RR 間隔の標準偏差; RMSSD, 連続して隣接する RR 間隔の差の二乗の平均値の平方根; pNN50, 連続した隣接した RR 間隔の全ての個数に占める差が 50msec を超える心拍の割合.

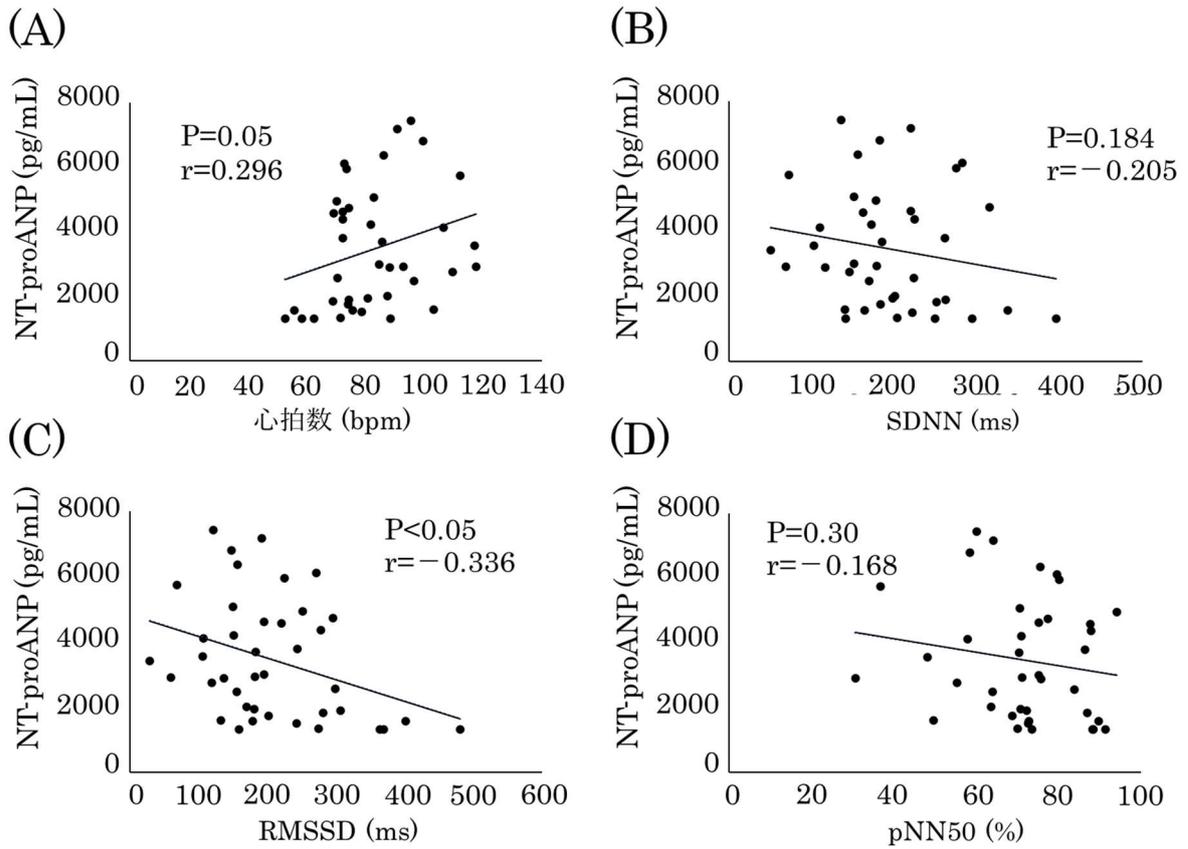


図 2-3. 血漿 NT-proANP 濃度と各変数の相関

A, vs 心拍数; B, vs SDNN; C, vs RMSSD; D, vs pNN50. NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; SDNN, 全 RR 間隔の標準偏差; RMSSD, 連続して隣接する RR 間隔の差の二乗の平均値の平方根; pNN50, 連続した隣接した RR 間隔の全ての個数に占める差が 50msec を超える心拍の割合.

## 2.4 考察

実験 1 では、血漿 NT-proANP 濃度は食事の前後で変化しなかった。ラットでは、飲水量の増加による静脈還流量の増加およびそれに伴う心房負荷によって血漿 NT-proANP 濃度は上昇することが報告されている[85]。実験 1 でも食後 15 分以内に全頭が飲水したため、一過性に心房圧が上昇した可能性がある。しかし、食事の前後で血漿 NT-proANP 濃度が上昇しなかったことを踏まえると、心房圧は上昇していたとしても血漿 NT-proANP 濃度には影響しない程度であり、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度は食事および飲水の影響を受けないと考えられた。

血漿 NT-proANP 濃度は、16:30 に 5 頭中 4 頭で一過性の増加を、そして全頭で 22:30 以降は減少傾向を示した。このことから、統計学的有意差は認められなかったが、血漿 NT-proANP 濃度にはある程度の日内変動が存在する可能性が考えられた。また、実験 1 で最も高値であった血漿 NT-proANP 濃度は個体 1 が示した値で、7432 pg/mL であった。この値は過去にうっ血性心不全のイヌで設定されたカットオフ値である 1200 pmol/L (12550 pg/mL; 分子量 10466 で計算)を下回る[13]。そのため、健康なイヌでの血漿 NT-proANP 濃度の日内変動はうっ血性心不全の判断には影響しないと思われた。

実験 2 で血漿 NT-proANP 濃度が 16:30 に一過性の上昇傾向を示した理由として、交感神経活性の亢進が関与している可能性がある。19:30 の心拍数は 16:30 のそれと比較して増加していた。また、19:30 の SDNN, RMSSD および pNN50 は 16:30 のそれらと比較して低下傾向を示していた。心拍数は交感神経活性の亢進に伴い増加する[15]。HRV 解析の 1 種である時間領域解析は、交感神経活性および迷走神経活性の変化から生じた RR 間隔の変動を利用した解析方法であり、SDNN および RMSSD は HRV の変動度合の指標、そして pNN50 は迷走神経活性の指標として用いられる。そのため、SDNN, RMSSD および pNN50 の低下は交感神経活性の亢進およびまたは迷走神経活性の低下を示唆する[10,84,91]。このことから、19:30 の時点では 16:30 と比較して交感神経活性は亢進していたと思われる。この理由として、16:30 まで睡眠状態だったイヌが起床し、全頭が覚醒状態にあったこと、そして食事前で興奮状態でもあったことが考えられる。ANP には心拍数を低下させ、交感神経抑制作用があることが報告されている[4]。過去のヒトの報告では、コルチコトロピン放出ホルモンの投与後に ANP を投与することで交感神経活性が抑制されることを明らかにしている[7]。実験 2 では、心拍数および

HRVが採血の影響を受けることを懸念して、心拍数およびHRVの解析には採血時刻の20分前のデータを用いた。そのため、心拍数およびHRVの結果と血漿NT-proANP濃度の結果には僅かなタイムラグが存在した。このことから、16:30から19:30の間は交感神経活性の亢進に伴いANPの分泌量は増加していた可能性があり、その結果、血漿NT-proANP濃度も上昇したと思われた。

実験2では、血漿NT-proANP濃度は夜間に減少傾向を示した。このことは、ヒトで血漿ANP濃度の日内変動を調査した過去の報告と類似する[98,99]。心拍数も多少の変動はあるものの、22:30から翌日4:30までの間は19:30の時点と比較して減少傾向にあった。また、翌日の4:30にSDNNは10:30と比較して有意に増加し、RMSSDおよびpNN50も22:30から翌日4:30にかけて個体差はあるが増加傾向にあった。心拍数およびHRVの結果より、22:30から翌日4:30の間は睡眠に伴い迷走神経活性が亢進していたと思われる。この結果は、イヌでの睡眠時の自律神経機能を評価した過去の報告と類似している[119]。7:30の時点でHRVに個体差が認められた理由としては、一部のイヌが起床し、覚醒状態にあったためだと思われる。ヒトではSDNNと血漿ANP濃度が相関することが報告されていること[54]、そして実験2でも血漿NT-proANP濃度とRMSSDが有意に相関したことから、血漿NT-proANP濃度の減少にも自律神経機能が関与していると思われた。しかし、翌日の7:30の時点では血漿NT-proANP濃度は依然として減少していたものの、心拍数および各HRVパラメータは一部のイヌで増加していた。このことから、22:30から翌日の4:30までの血漿NT-proANP濃度の減少は、自律神経機能ではない別の要因も関係している可能性が高い。実験2では、血漿NT-proANP濃度以外の評価項目に心拍数およびHRVしか含めていなかったため、血漿NT-proANP濃度が夜間に低下した理由に関しては明らかにできなかった。

実験2では、血漿NT-proANP濃度は心拍数と有意に相関しなかった。その理由の1つとして、頻脈を示したイヌが1頭もいなかったことが挙げられる。血漿ANP濃度および心拍数の関連性を調査した過去のイヌの報告では、心拍数を350 bpmに上昇させると右房圧が上昇し、これに伴い血漿ANP濃度が増加することを明らかにしている[122]。一般的に、イヌでは心拍数160 bpm以上が頻脈とされているが[96]、実験2ではこの値を超える心拍数を示したイヌはいなかった。血漿NT-proANP濃度は交感神経活性の亢進に伴い上昇する可能性があることを踏まえると、イヌでは頻脈時に血漿NT-

proANP 濃度が変動するかもしれない。

本章の2つの実験にはいくつかの制限が存在する。第1に、本章では血漿NT-proANP濃度以外の血液および尿検査項目を含めなかった。血漿NT-proANP濃度は、心拍数およびHRV以外の要因でも日内変動を起こすことが報告されている。イヌでは、夜間（特に睡眠中）に循環血液量の減少、そしてそれに伴う血圧低下に対して、循環を維持するためにレニン活性が上昇することが報告されている[76]。健康なヒトでは、血漿ANP濃度とレニン活性の日内変動は関連することが報告されている[93]。そのため、夜間の睡眠時に血漿NT-proANP濃度が減少したことは、自律神経機能だけでなく、レニン活性の増加など他の要因が関与している可能性が考えられた。第2に、実験2の採血間隔が3時間であったことが挙げられる。実験2では、交感神経活性が亢進する時のみ血漿NT-proANP濃度の上昇が心拍数およびHRVと関連する可能性が考えられた。しかし、14:30から19:30のどのタイミングで血漿NT-proANP濃度が交感神経活性の亢進に伴い上昇するか、そして交感神経活性よりも迷走神経活性が優位になって以降、どのタイミングで血漿NT-proANP濃度が減少傾向を示すかといった経時的変化を追跡することができなかった。

## 2.5 小括

本章では、血漿NT-proANP濃度に対する食事の影響および日内変動を評価し、血漿NT-proANP濃度に日内変動が存在する場合、この変動に自律神経機能が関与しているか否かも併せて調査した。その結果、血漿NT-proANP濃度は食事の影響は受けないが、夜間に減少傾向を示す可能性が考えられた。また、血漿NT-proANP濃度はRMSSDと逆相関を示し、交感神経活性が一時的に優位であったタイミングで一過性に血漿NT-proANP濃度が上昇した。この理由として、交感神経活性の亢進に伴い、交感神経を抑制するためにANPの分泌量が増加し、それによって血漿NT-proANP濃度が上昇したと考えられた。しかし、夜間から朝方7:30にかけて血漿NT-proANP濃度は減少傾向を示したのに対し、朝方4:30から7:30にかけて心拍数およびHRVは一定の傾向が認められず、夜間に血漿NT-proANP濃度が減少した原因は明らかにできなかった。こちらに関しては血漿レニン活性といった自律神経機能以外の要因を更に調査する必要があると考えられた。

### 第3章

イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム  
利尿ペプチドおよび N 末端プロ B 型  
ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する  
水和状態の影響に関する検討

### 3.1 緒言

イヌでは、血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proANP) および N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP) 濃度はいずれも心疾患の進行に伴い上昇することが知られている[27,43]。しかし、心臓バイオマーカー (CB) は、水和状態の影響を受けることがある[26,29,110]。脱水状態では、血漿 ANP および BNP 濃度は減少傾向を示す[26]。脱水による血漿 ANP 濃度の減少は、イヌ、マウスおよびヒトコブラクダで報告されている[5,117,121]。NT-proANP は ANP と等モル量で血中へ放出されるため[102]、脱水時には血漿 ANP 濃度と同様に血漿 NT-proANP 濃度も減少する可能性がある。しかし、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度に対する脱水の影響を調査した研究はない。また、ヒトでは脱水時に心室容積の減少に伴い、心室筋の伸展性が低下するため、血漿 NT-proBNP 濃度は減少することが報告されている[26,109]。イヌでは、血漿 NT-proANP 濃度と同様、血漿 NT-proBNP 濃度の脱水に対する影響も明らかにされていない。

うっ血性心不全の臨床徴候を示すイヌでは、その治療のためにフロセミドといった利尿薬が投与されるため、ナトリウム (Na) 欠乏を伴う体液量減少 (低張性脱水) が生じることがある[92]。イヌで脱水時に血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が減少するのであれば、利尿薬が投与されているイヌでは、これらの CB は心疾患の重症度を過小評価する可能性がある。また、ヒトでは血漿 ANP 濃度が脱水時に減少することを利用して、血漿 ANP および BNP 濃度を血液透析実施後の体液量の指標として用いることがある[22,90]。血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の値が脱水の程度によって変化するのであれば、イヌでもこれらの CB は血液透析時に体液量の指標として有用となるかもしれない。

そこで本章では、イヌでの血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度に対する脱水の影響を評価することを目的とした。

### 3.2 材料および方法

#### 供試動物

本章では第 2 章で用いたビーグル犬 5 頭を使用した。全てのイヌが臨床的に健康であることを確認するために、第 2 章と同様の検査を実施した。本実験は、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行われた（承認番号 2021S-27）。

## 脱水プロトコル

本章では全てのイヌで、脱水モデルの作製前に 12 時間以上の絶食時間を設け、尿道カテーテルによって膀胱内を空にした。脱水モデルを作製するため、フロセミド（ラシックス、サノフィ株式会社、東京）を 1-2 時間おきに 2-4 mg/kg の用量でイヌに静脈投与した[19]。フロセミドの投与後、5 %以上の体重減少が認められ、かつ身体診察（口腔内の湿潤性、皮膚つまみ試験および毛細血管再充満時間）にて脱水所見が認められた時点を脱水モデル完成とした。脱水モデルが完成した時点から、体重が回復し、身体診察にて脱水所見が認められなくなるまで水和状態の改善を目的に水道水を与えた。脱水モデル作製前をポイント 1（ベースライン[BL]）、脱水モデル完成時をポイント 2、そして脱水が改善したと判断した時点をポイント 3 とした。各ポイントにおいて、身体診察、血圧測定、採血および心エコー図検査を実施した。なお、身体診察は各ポイント間で 30 分毎に実施することで、体重および脱水の程度を確認した。以上の脱水プロトコル実施中、全てのイヌは絶水および絶食とし、検査時以外にはステンレス製ケージ内で管理した。

## 評価項目

評価項目は、CB 検査（血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度）、血液化学検査（血漿総蛋白[TP], アルブミン[ALB], 尿素窒素[UN], クレアチニン[Cre], Na, カリウム[K] およびクロール[Cl]濃度）、血液ガス検査（pH, 二酸化炭素分圧[pCO<sub>2</sub>], 重炭酸イオン[HCO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>およびヘマトクリット[Ht]値）、体重、心拍数（身体診察時に測定）、収縮期血圧および心エコー図検査（左房内径[LA], LA 大動脈根内径比 [LA/Ao], 拡張期左室内径[LVIDd], 体重で標準化した LVIDd[LVIDdN], 拡張期心室中隔壁厚[IVSd], 拡張末期左室自由壁厚[LVPWd]および左室拡張早期流入血流速[拡張早期波; E 波, 心房収縮期波; A 波]）とした。

## 血液検体

血液をイヌの頸静脈から採取し、ヘパリンチューブ（富士フィルム株式会社、東京）および EDTA-2K（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、福島）にそれぞれ 2 mL ずつ

分注し、いずれも 3000 rpm 5 分間で遠心分離した。血液ガス検査には、ヘパリンチューブに分注した遠心分離前の静脈血を用いた。血液化学検査にはヘパリンチューブから得られた血漿を用いた。CB の測定には EDTA-2K から得られた血漿を使用し、測定まで -80 °C で凍結保存し、外部検査機関（血漿 NT-proANP 濃度; 共立製薬株式会社, 東京, 血漿 NT-proBNP 濃度; IDEXX ラボラトリーズ株式会社, 東京)に測定を委託した。

血漿 NT-proANP 濃度の測定法は、第 2 章と同様であった。血漿 NT-proBNP 濃度は、サンドイッチ酵素結合免疫吸着法を用いて測定した。血漿 NT-proBNP 濃度の検出限界値は 10000 pmol/L であり、この値を上回った場合は蒸留水で希釈した。

### 血圧測定

本章では、ドプラ血圧計 (Vet Dop2, Vmed Technology, WA) を用いて収縮期血圧を測定した。血圧測定は、アメリカ獣医内科学会の全身性高血圧に対するガイドラインに従って実施した[2]。

### 心エコー図検査

心エコー図検査は、6-12MHz のプローブを装備した SSA-660A (キャノンメディカルシステムズ株式会社, 栃木) を用いて実施した。心エコー図検査中は、心電図 (II 誘導) を同時記録した。LA/Ao は、右側傍胸骨心基部短軸像で拡張早期の左房径を同じ時相の大動脈根内径で除することで算出した[14]。LVIDd, IVSd および LVFWd は、M モード法を用いて右側傍胸骨左室短軸像 (乳頭筋レベル) で測定した。これらの測定にはリーディング・エッジ・トゥ・リーディング・エッジ法を用いた。LVIDdN は以下の式を用いて算出した[24,40]。

$$\text{LVIDdN} = \text{LVIDd [cm]} / \text{体重 [kg]}^{0.294}$$

左室拡張早期流入血流速は、左心室に流入する血流波形のうち、心電図の T 波のはじまりから P 波の出現までに認められた波形を E 波、そして P 波の出現直後に認められた波形を A 波とした。

### 統計学的解析

全ての統計解析には、市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24 (日本 IBM 株式

会社, 日本)を用いた. 各変数に対する正規性の評価には Shapiro Wilk 検定を用いた. 各変数は, Mann-Whitney 検定および Bonferroni 補正を用いてポイント 1, 2 および 3 で比較した. 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度と各変数の関連性は, 直線回帰分析を用いて評価した.  $P<0.05$  を統計学的に有意と判断した.

### 3.3 結果

#### 脱水モデルの特徴

本章では, 脱水プロトコル開始から脱水モデル作製までの時間の中央値は 270 (最小-最大, 222-275) 分, そして脱水モデルが完成した時点から脱水が改善したと判断した時点までの時間の中央値 (最小-最大)は 95 (70-100) 分であった. 脱水モデル完成までに必要としたフロセミドの投与総量の中央値 (最小-最大)は 5 (4-7) mg/kg であった.

#### 変数の各ポイント間での比較

各ポイントでの変数の結果を表 3-1 および 3-2 に示す. 血漿 NT-proANP 濃度はポイント 1 と比較してポイント 2 および 3 で有意に減少した (それぞれ  $P<0.05$ ). いっぽう, 血漿 NT-proBNP 濃度はポイント 1 と比較してポイント 2 および 3 で減少傾向を示したが, いずれのポイント間でも有意差を示さなかった (図 3-1). 血漿 TP, ALB および UN 濃度は, ポイント 1 と比較してポイント 2 および 3 で有意に上昇した (それぞれ  $P<0.05$ ). 血漿 Na および Cl 濃度は, ポイント 1 および 2 と比較してポイント 3 で有意に減少し (それぞれ  $P<0.05$ ), そして血漿 K 濃度はポイント 1 と比較してポイント 2 および 3 で有意に減少した (それぞれ  $P<0.05$  および  $P<0.01$ ). LA, LVIDd および LVIDdN は, ポイント 1 と比較してポイント 2 で有意に減少した ( $P<0.05$ ). その他の変数は, いずれのポイント間でも有意差は認められなかった.

表 3-1. 血液検査項目の各ポイント間での比較

	ポイント1	ポイント2	ポイント3
NT-proANP (pg/mL)	3278 (2219–8595)	3055 <sup>a</sup> (1315–7008)	2923 <sup>a,b</sup> (1315–6891)
NT-proBNP (pmol/L)	567 (310–1079)	474 (250–711)	442 (250–744)
TP (g/dL)	6.9 (6.4–7.5)	8.5 <sup>a</sup> (7.8–8.7)	7.7 <sup>a,b</sup> (6.9–7.9)
ALB (g/dL)	3.7 (3.5–4.1)	4.7 <sup>a</sup> (4.3–5.1)	4.3 <sup>a,b</sup> (3.8–4.7)
UN (mg/dL)	11.4 (10.0–13.4)	13.3 <sup>a</sup> (11.7–14.7)	16.7 <sup>a,b</sup> (14.3–22.9)
Cre (mg/dL)	0.64 (0.57–0.68)	0.61 (0.56–0.79)	0.76 (0.61–0.95)
Na (mEq/L)	146 (116–147)	124 (111–145)	116 <sup>a,b</sup> (104–135)
K (mEq/L)	4.0 (3.0–4.2)	2.9 <sup>a</sup> (2.3–3.1)	2.8 <sup>a</sup> (2.3–3.5)
Cl (mEq/L)	111 (85–116)	89 (79–108)	77 <sup>a,b</sup> (68–99)
pH	7.45 (7.39–7.48)	7.48 (7.47–7.50)	7.49 (7.37–7.57)
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	31 (27–37)	30 (27–34)	33 (24–45)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	21.5 (20.1–22.4)	23.1 (20.1–24.7)	24.9 (22.0–26.3)
Ht (%)	50 (41–51)	54 (47–58)	51 (44–55)

データは中央値 (最小–最大)で示す。a, P<0.05 vs ポイント 1; b, ポイント 2, P<0.05 vs ポイント 2。ベースライン; ポイント 2, 脱水モデル完成時; ポイント 3, 脱水改善時; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; TP, 総蛋白; ALB, アルブミン; UN, 尿素窒素; Cre, クレアチニン; Na, ナトリウム; K, カリウム; Cl, クロール; pCO<sub>2</sub>, 二酸化炭素分圧; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 重炭酸イオン; Ht, ヘマトクリット。

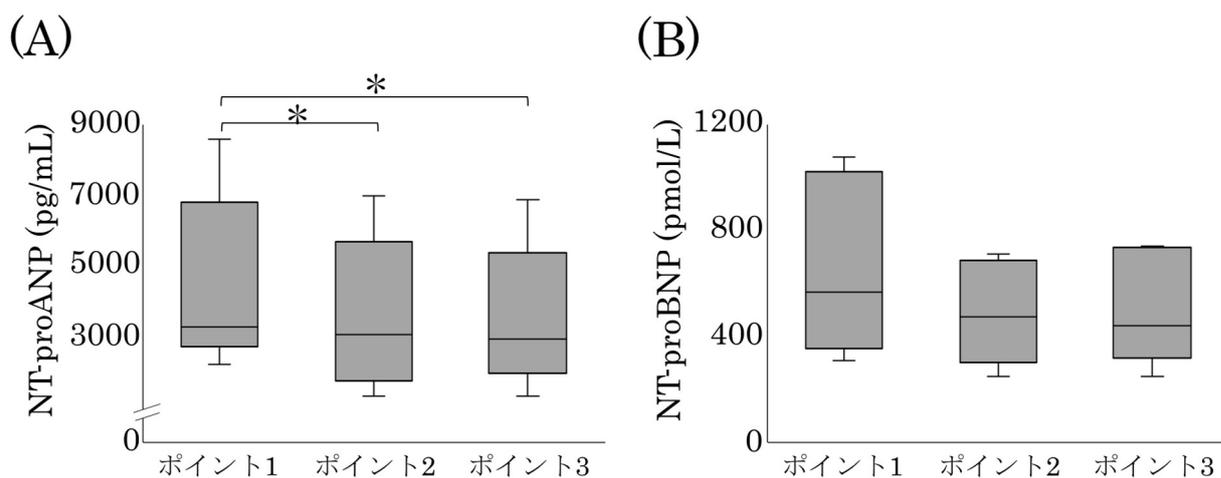


図3-1. 各ポイント間でのCBの比較

箱は四分位範囲を、そして箱の中央線は中央値を示す。ひげは上下四分位範囲の1.5倍を超えた値を示している。A, 血漿NT-proANP濃度; B, 血漿NT-proBNP濃度。CB, 心臓バイオマーカー; NT-proANP, N末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド; ポイント1, ベースライン; ポイント2, 脱水モデル完成時; ポイント3, 脱水改善時; \*,  $P < 0.01$ .

表 3-2. 評価項目 (血液検査項目以外)の各ポイント間での比較

	ポイント1	ポイント2	ポイント3
体重 (kg)	13.15 (11.49–14.15)	12.52 <sup>a</sup> (10.99–13.45)	13.40 <sup>a,b</sup> (11.63–14.50)
心拍数 (bpm)	121 (94–135)	120 (105–130)	146 <sup>b</sup> (132–154)
収縮期血圧 (mmHg)	158 (148–181)	152 (140–164)	157 (156–171)
LA (mm)	22.9 (21.6–23.7)	18.7 <sup>a</sup> (17.6–20.1)	21.4 (15.5–25.3)
LA/Ao	1.16 (1.03–1.32)	1.02 (0.96–1.43)	1.25 (0.96–1.27)
LVIDd (mm)	33.7 (30.3–36.7)	28.0 <sup>a</sup> (25.6–32.2)	33.2 (25.1–34.6)
LVIDdN	1.58 (1.39–1.73)	1.33 <sup>a</sup> (1.19–1.55)	1.54 (1.22–1.62)
IVSd (mm)	9.2 (9.2–9.8)	10.3 (9.6–11.1)	9.8 (4.6–11.1)
LVPWd (mm)	8.8 (5.9–10.9)	8.7 (7.2–11.4)	9.9 (7.0–10.4)
E 波流速 (m/秒)	0.89 (0.60–0.92)	0.69 (0.58–0.80)	0.69 (0.52–0.78)
A 波流速 (m/秒)	0.47 (0.35–0.58)	0.43 (0.31–0.60)	0.35 (0.27–0.49)

データは中央値 (最小–最大)で示す. ポイント 1, ベースライン; ポイント 2, 脱水モデル完成時; ポイント 3, 脱水改善時; LA, 左房内径; LA/Ao, LA 大動脈根内径比; LVIDd, 拡張期左室内径; LVIDdN, 体重で標準化した LVIDd; IVSd, 拡張期心室中隔壁厚; LVPWd, 拡張末期左室自由壁厚; E 波, 拡張早期波; A 波, 心房収縮期波; a, P<0.05 vs ポイント 1; b, P<0.05 vs ポイント 2.

## CB と各変数の相関性

単変量解析では、血漿 NT-proANP 濃度と血漿 NT-proBNP 濃度 ( $R^2=0.284$ )および脱水前後の体重 ( $R^2=0.178$ )が有意に正相関し (それぞれ  $P<0.05$ ; 図 3-2), そして血漿 NT-proBNP 濃度と血漿 Na 濃度 ( $R^2=0.439$ ), 血漿 K 濃度 ( $R^2=0.444$ ), 血漿 Cl 濃度 ( $R^2=0.419$ ), LVIDd ( $R^2=0.519$ )および LVIDdN ( $R^2=0.535$ )が有意に正相関した (それぞれ  $P<0.01$ ; 図 3-3). 特に, 体重の減少に伴い, 血漿 NT-proANP 濃度は減少する傾向が認められた (図 3-2B).

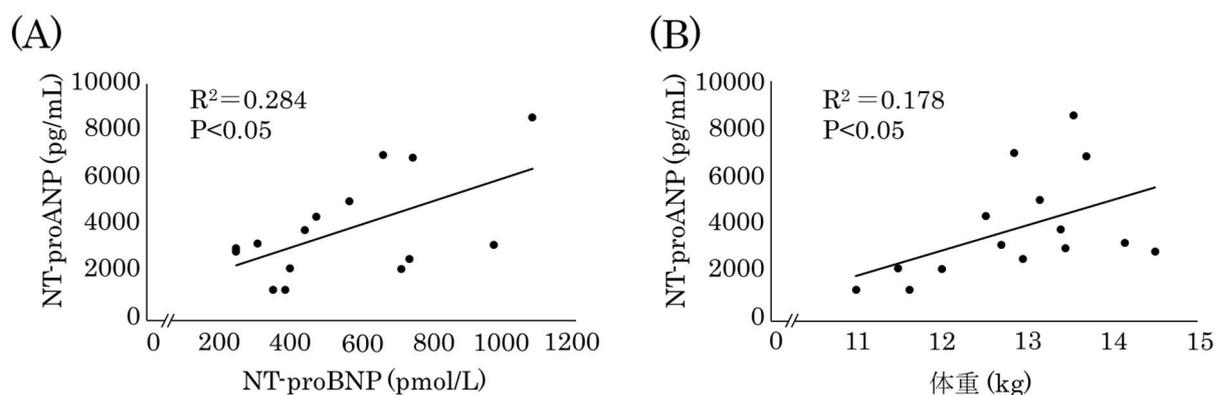


図 3-2. 血漿 NT-proANP 濃度と有意に相関した変数の散布図

A, vs 血漿 NT-proBNP 濃度; B, vs 体重. NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド.

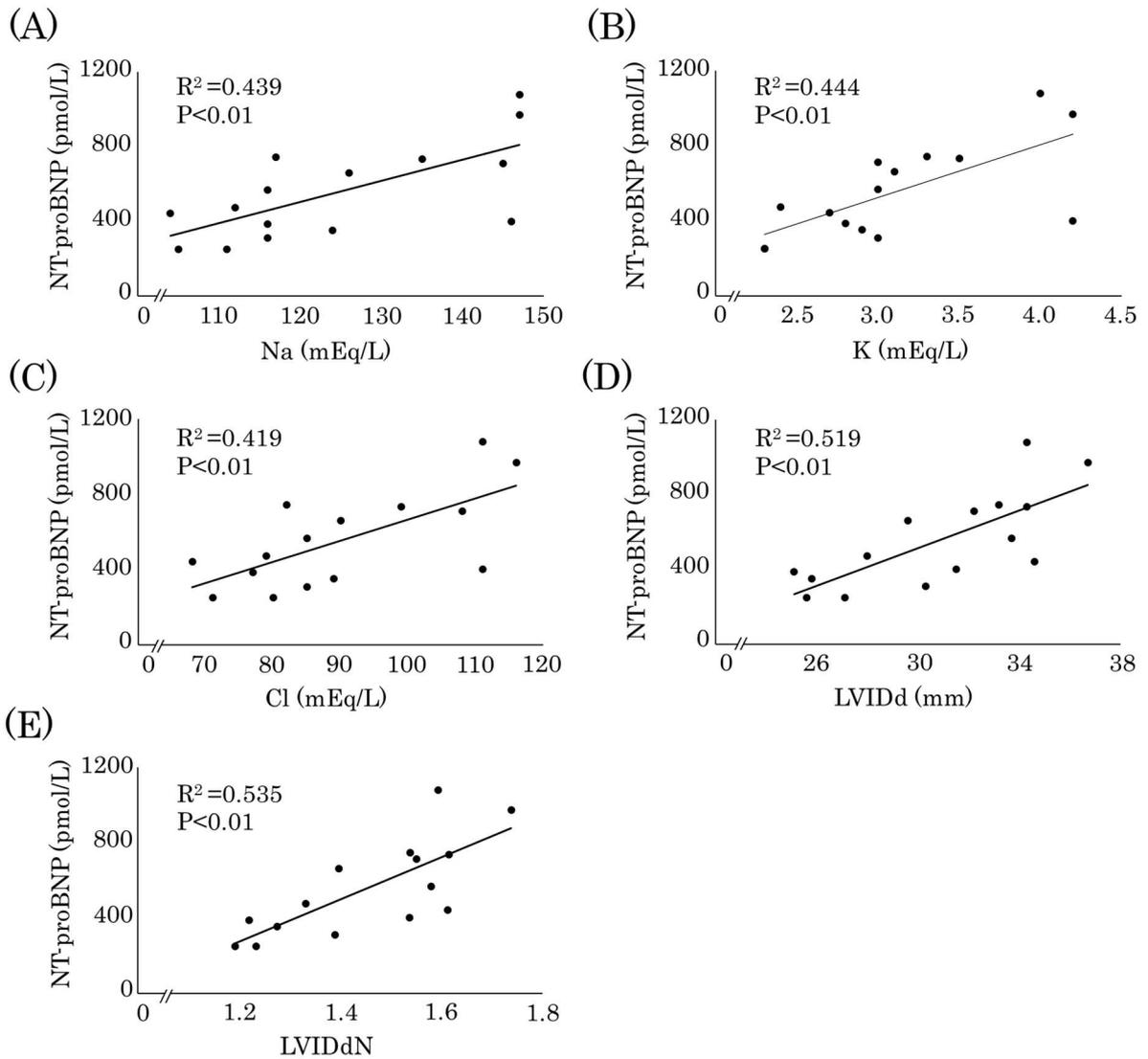


図 3-3. 血漿 NT-proBNP 濃度と有意に相関した変数の散布図

A, vs 血漿 Na 濃度; B, vs 血漿 K 濃度; C, vs 血漿 Cl 濃度; D, vs LVIDd; E, vs LVIDdN.

NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; LVIDd, 拡張期左室内径;

LVIDdN, 体重で標準化した LVIDd.

### 3.4 考察

血漿 NT-proANP 濃度は脱水によって有意に減少した。この結果は、脱水による血漿 ANP 濃度の影響を調査した過去のイヌの報告と類似している[121]。このことから、脱水状態のイヌでは、血漿 NT-proANP 濃度は心疾患の重症度を過小評価する可能性があり、結果の解釈には注意が必要と思われる。また、ヒトの透析患者では、体液量の減少に伴い血漿 ANP 濃度が減少することを利用し、透析時の除水による過度な体液量減少を防ぐため、血液透析後の体液量の指標として体重だけでなく、血漿 ANP 濃度も併せて測定することがある[52,78,126]。ヒトでは、血液透析実施時の血漿 NT-proANP 濃度に関する研究も存在するが、この研究では心不全の合併により血漿 NT-proANP 濃度が上昇することを報告しており、体液量の指標として血漿 NT-proANP 濃度が有用か否かは議論されていない[8]。ヒトでは未だに明らかにされていないが、本章で血漿 NT-proANP 濃度は体重減少に伴い有意に減少したことから、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度が血液透析後の体液量の指標として活用できるかもしれない。

脱水が改善したと判断した時点では、血漿 NT-proANP 濃度は BL 時の値まで回復せず、減少したままであった。血漿 NT-proANP 濃度は、血漿 Na 濃度と有意に相関しなかったが、血漿 Na 濃度も脱水モデル完成時には減少傾向を示し、体重が増加し、身体診察から脱水が改善したと判断した時点では有意に減少したままであった。また、図 3-2B では血漿 NT-proANP 濃度は体重減少に伴って大きく減少したが、体重が増加し、脱水が改善したと判断した時点ではその濃度にばらつきが認められた。本章では、12 時間以上絶食させたイヌにフロセミドを投与することで脱水モデルを作成し、水道水を与え、体重が回復し、身体診察にて脱水所見が認められなくなった際に脱水が改善されたと判断した。しかし、上記の結果を踏まえると、脱水が改善したと判断した時点では、水道水を与えていたために総体液量は増加したものの、12 時間以上の絶食も伴った塩分摂取の不足は補うことが出来ず、血清浸透圧の低下を伴う細胞外液の減少、つまり低張性脱水の状態にあった可能性が考えられた。そのため、脱水が改善したと判断した時点でも血漿 NT-proANP 濃度が依然として減少していた理由として、低張性脱水の影響が考えられた。

血漿 NT-proBNP 濃度は、過去のヒトの報告と異なり[109]、脱水前後で統計学的有意差は認められなかった。しかし、血漿 NT-proBNP 濃度は脱水モデル作製前と比較して、

脱水モデル完成時および脱水改善時に減少傾向を示した。また、血漿 NT-proBNP 濃度が血漿 Na および NT-proANP 濃度と相関したことを踏まえると、血漿 NT-proBNP 濃度もより重度の脱水時には減少する可能性が考えられた。したがって、イヌでは血漿 NT-proBNP 濃度は軽度の脱水であれば CB として利用可能と考えられるが、より重度な脱水下では、その濃度の解釈に注意が必要であると思われる。

本章では、血漿 NT-proANP 濃度は心エコー図検査のいずれのパラメータとも相関しなかった。血漿 ANP 濃度が脱水時に低下することを明らかにした過去のイヌの報告では、脱水による循環血液量の減少、そしてそれに伴う心房筋の伸展性の低下が血漿 ANP 濃度の減少に関与すると考察している[121]。本章の結果では、LAは血漿NT-proANP濃度と同様に、脱水モデル完成時に有意な減少を示したことから、血漿 NT-proANP 濃度の減少には心房筋の伸展性の低下が関与していると思われた。しかし、血漿 NT-proANP 濃度は LA および LA/Ao と相関しなかった。このことから、本章で認められた血漿 NT-proANP 濃度の減少は、心房筋の伸展性とは別の機序が関与した可能性も考えられた。ヒトでは、一酸化窒素が NT-proANP の血中への放出を抑制する因子として働くことが報告されている[103]。そして、一酸化窒素は脱水時に上昇することが過去のマウスの報告で明らかにされている[32,36]。本章では、脱水モデル完成時の収縮期血圧は BL とほぼ変わりなかった。このことは、循環血液量の減少に対し、血管が収縮することで血圧を維持しようとしていた結果かもしれない。一酸化窒素には血管拡張作用があり、脱水に伴う血管収縮時に増加することが報告されている[36]。そのため、本章では脱水に伴う一酸化窒素の上昇による NT-proANP の血中への放出抑制といった体液の恒常性を維持する機構が働いていた可能性がある。そして、このことは血漿 NT-proANP 濃度が血漿 NT-proBNP 濃度とは異なり、心エコー図検査パラメータと相関せず、体重のみと相関して減少した要因の 1 つかもしれない。

血漿 NT-proBNP 濃度は血漿 NT-proANP 濃度とは異なり、左室内径を示す LVIDd および LVIDdN と有意に相関した。ヒトでは脱水時に心室容積が減少し、それに伴い心室の進展性も低下するため、血漿 NT-proBNP 濃度は減少することが報告されている[109]。健康なイヌでは、NT-proBNP の多くが心室で生成される[118]。また、本章では、血漿 NT-proBNP 濃度は血漿 Na 濃度とも有意に相関した。ループ利尿薬であるフロセミドは、ヘンレ上行蹄の  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$  共輸送体を阻害するため、フロセミド投与後は血

漿 Na, K および Cl 濃度はいずれも低下する[92]. 以上のことから, 本章で血漿 NT-proBNP 濃度が脱水時に示した減少傾向は, 脱水 (特に低張性脱水)に伴う左室内径減少によるものであると思われた.

本章にはいくつかの制限が存在する. 第 1 に, 本章では脱水の改善に水道水の自発的な摂取を採用したため, 摂取した水が腸から吸収されるまでの時間, そして実際に細胞外液内に入り体液量が回復するまでの時間にはタイムラグが生じていたと思われる. 脱水モデルを作成した過去のネコの報告では, 水和状態の改善に輸液療法を採用している[19]. この研究では本章とは異なり, 8%脱水のモデルを作成していた. 本章の脱水モデルは 5%脱水であったこと, そして脱水時に認められた体重減少および身体診察所見が水道水の給与のみで回帰したことを踏まえると, 輸液療法の実施は過水和を招く可能性があった. 脱水改善後の CB の変化に関しては, 脱水の改善方法の検討も含め今後更なる研究が必要であると思われた. 第 2 に, 本章では脱水が改善したか否かを体重および身体診察所見のみで判断した. 本章では脱水モデルを作成したネコの過去の報告と同様の方法で脱水の改善を判断したが[19], 本章の血漿 Na 濃度の結果を踏まえると, 水道水を与えた後に実施した身体診察所見は, 実際の脱水状態を過小評価していた可能性が考えられた. そのため, 脱水改善後の CB を調査する際には血漿 Na 濃度が BL 時の値まで回復しているかも考慮する必要があると考えられた.

### 3.5 小括

本章では, 健康なイヌを用いて, 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度に対する脱水の影響を評価した.

結果として, 血漿 NT-proANP 濃度は脱水時に有意に減少したが, 血漿 NT-proBNP 濃度は減少傾向を示したものの, 脱水前後で有意差は認められなかった. このことから, 脱水状態のイヌでは, 血漿 NT-proANP 濃度は心疾患の重症度を過小評価する可能性が考えられた. 血漿 NT-proBNP 濃度に関しても血漿 NT-proANP 濃度および血漿 Na 濃度と有意に相関したことから, より重度な脱水時には有意に減少する可能性が考えられた. なお, 本章では血漿 Na 濃度の結果から, 脱水が改善したと判断した時点では低張性脱水が依然として生じていた可能性が考えられた. そのため, これらの CB が体液量の指標としての活用できるか否かは, 今後さらなる研究が必要であると思われる.

## 第4章

イヌの血漿 N 末端プロ心房性  
ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する  
糸球体濾過量の影響

#### 4.1 緒言

血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proANP)濃度は、心疾患の進行に伴い上昇する心臓バイオマーカーの1つである[43,102]。イヌでは、血漿 NT-proANP 濃度のうつ血性心不全に対する感度および特異度はそれぞれ 95.5 %および 84.6 %と高値を示すことが報告されており、心臓バイオマーカーとしての有用性が期待されている[95]。しかし、心臓バイオマーカーは、心疾患以外の原因でも上昇する可能性がある。例えば、血漿 NT-proANP 濃度と同じく生理活性物質と共に血中へ放出される非生理活性物質の1つである血漿 NT-proBNP 濃度は、腎排泄に依存することから、腎機能の低下に伴い上昇することがイヌで報告されている[75]。これに対してイヌでは、血漿 NT-proANP 濃度の腎機能に対する影響は明らかにされていない。

ヒトでは、血中に放出された NT-proANP の 17 %が腎臓から排泄される[104]。重度心不全のヒトでは、血漿 NT-proANP 濃度および糸球体濾過量 (GFR)は負の相関を示すことが報告されている[101]。イヌでは、NT-proANP の腎臓からの排泄は明らかにされていないが、心不全のイヌでは心拍出量の低下によって GFR が低下し、高窒素血症を引き起こすことが知られている[79]。イヌでも NT-proANP が一部腎臓から排泄されるのであれば、GFR の低下が血漿 NT-proANP 濃度の上昇に関与するかもしれない。また、ネコでは血漿 NT-proANP 濃度が心疾患を併発していない場合でも、慢性腎臓病の末期ステージで上昇することが報告されている[61]。そのため、イヌでも血漿 NT-proANP 濃度は、心疾患に限らず GFR の低下に伴い上昇するかもしれない。

心疾患に罹患したイヌの過去の報告では、血漿 NT-proANP 濃度および血清クレアチニン (Cre)濃度は正相関を示し、血漿 NT-proANP 濃度が腎機能低下に伴い上昇する可能性が示唆された[13]。しかし、この報告では血漿 NT-proANP 濃度と血清 Cre 濃度の共線性、つまり血漿 NT-proANP 濃度の上昇が腎機能低下とは無関係に心房の拡大によって生じた可能性に関しては検討されていない。イヌで血漿 NT-proANP 濃度および GFR の関係を調査するには、心疾患を併発していない慢性腎臓病のイヌでの血漿 NT-proANP 濃度を調査する必要があると考える。現在、獣医療では血漿イオヘキソール・クリアランス (PCio)試験による GFR の測定が腎機能の指標として一般的に用いられている[74]。血清 Cre 濃度は、筋肉量の影響を受けることに加え、GFR との関係は直線的でないため、イヌで血漿 NT-proANP 濃度および GFR の関連を調査するには、GFR の

指標として PCio を用いるべきだと思われる。

イヌで血漿 NT-proANP 濃度が GFR の低下に伴い上昇する場合、慢性腎臓病を併発している心疾患のイヌでは、血漿 NT-proANP 濃度の結果の解釈に注意が必要であると思われる。そこで本章では、イヌでの血漿 NT-proANP 濃度と GFR の関連性を調査した。

## 4.2 材料および方法

### 供試動物

本章では、回顧的横断研究を採用し、2012年8月から2021年2月の間に日本獣生命科学大学附属動物医療センター腎臓科または外部の動物病院で PCio 試験が実施されたイヌを組み込んだ。全てのイヌの家族からインフォームド・コンセントを得た上で検体を収集した。問診および身体診察の結果（発咳、運動不耐性および心雑音の有無）から、心疾患が疑われたイヌは除外した。

### 評価項目

評価項目は、体重、年齢、血漿尿素窒素 (UN)、Cre、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、カルシウム (Ca) およびリン (IP) 濃度、尿比重 (USG)、PCio、そして血漿 NT-proANP 濃度とした。

### 血液検体

頸静脈、橈側皮静脈または大腿静脈のいずれかから採血し、ヘパリンチューブ（富士フィルム株式会社、東京）に 2 mL、そして EDTA-2K（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、福島）に 2 mL 分注し、いずれも 3000 rpm、5 分間で遠心分離した。ヘパリンチューブから得られた血漿を用いて血液化学検査を実施した。EDTA-2K から得られた血漿は、血漿 NT-proANP 濃度を測定するために -80 °C で保管し、外部検査機関（共立製薬株式会社、東京）に測定を委託した。血漿 NT-proANP 濃度の測定は、第 1 章と同様の方法で測定した。

## PCio の測定方法

イオヘキソールには、市販されている非イオン系のヨード系造影剤（イオヘキソール 300 注 100 mL, 光製薬株式会社, 東京）を用いた。

PCio 試験は過去の研究に準じて実施した[74]。採血後に橈側皮静脈に設置した留置針からイオヘキソールを 30 秒かけて投与した。イオヘキソールの投与量は、血漿クレアチニン濃度が 2.0 mg/dL を超えた場合は、45 mgI/kg とし、そしてこれ以下の場合は 90 mgI/kg とした。投与が完了した時点を 0 分として 120, 180 および 240 分後に採血し、血漿を分離した。血漿イオヘキソール濃度はセリウム-ヒ素比色定量法により測定した。これは血漿中イオヘキソールをアルカリ加水分解によって脱ヨウ素化し、遊離したヨウ素を定量するものであり、測定法の概要は以下の通りである。

血漿 50  $\mu$ L をスクリー・キャップ付き 10 mL 試験管にマイクロピペットで分注し、0 分の血漿はブランクとして用いた。標準液 (15  $\mu$ L/mL) は、別の試験管にイオヘキソール標準液 50  $\mu$ L および血漿ブランク 50  $\mu$ L を混合して作成した。1M 水酸化ナトリウム 5 mL を加え、試験管に栓をして攪拌後、90  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。Working solution は 1M 硫酸, bromide-bromate-solution およびヒ素試薬を 5:1:4 の割合で混合して作成した。加水分解後の反応液は 100  $\mu$ L ずつ Working solution 1 mL に分注し、十分に攪拌した後に室温で 20 分間静置した。これにセリウム溶液を 100 $\mu$ L ずつ加え攪拌し、再び 20 分間静置し、その後 410 nm で吸光度 (A) を測定した。吸光度からのイオヘキソール濃度 (C) の算出には以下の式を用いた。

$$C = C_{\text{standard}} \times \log (A_{\text{blank}}/A_{\text{sample}}) / \log (A_{\text{blank}}/A_{\text{standard}})$$

$C_{\text{standard}}$  : 標準液のイオヘキソール濃度 (15  $\mu$ g/mL)

$A_{\text{standard}}$  : 標準液の吸光度 (nm)

$A_{\text{blank}}$  : ブランクの吸光度 (nm)

$A_{\text{sample}}$  : 測定検体の吸光度 (nm)

PCio は Broshner-Mortense (BM) 式で補正した 1 区画モデルにより算出した。1 区画モデルでは、指標物質が生体内に急速に分布すると仮定した場合、生体は 1 つの区画として見なすことができ、濃度-時間曲線下面積 (AUC) は消失曲線の排泄相の傾き ( $-\beta$ ) および切片 (B) から求められる。

$$C(t) [\mu\text{g/mL}] = B \times \exp^{-\beta t}$$

$$\text{AUC} [\text{min} \cdot \mu\text{g/mL}] = B/\beta$$

イオヘキソールの血漿クリアランス (Cl)は以下の公式によって算出し, PCioは以下のようにBM式によってCl値を補正することで算出する. 求められたPCioはすべて体重(kg)で標準化した.

$$\text{Cl} [\text{mL/min}] = \text{イオヘキソール投与量} (\mu\text{g})/\text{AUC}$$

$$\text{PCio} [\text{mL/min}] = 0.990778 \times \text{Cl} - 0.001218 \times \text{Cl}^2 [74]$$

本章では過去の報告に基づき, PCio が 1.8 mL/min/kg を超えていたイヌを正常群, 0.9–1.8 mL/min/kg であったイヌを軽度 GFR 低下群 (M-GFR 群),そして 0.9 mL/min/kg 未満であったイヌを重度 GFR 低下群 (S-GFR 群)に分類した[75].

#### 統計学的解析

全ての統計解析には, 市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24 (日本 IBM 株式会社, 日本)を用いた. 各変数に対する正規性の評価には Shapiro Wilk 検定を用いた. 各群での血漿 NT-proANP 濃度の性差の確認, そして各変数の正常群, M-GFR 群および S-GFR 群間の比較には, Kruskal-Wallis 検定および事後検定として Steel-Dwass 検定を用いた. 血漿 NT-proANP 濃度および PCio と各変数の関連性は, Spearman の順位相関係数を用いて単変量解析を実施した. PCio に関しては, 単変量解析にて有意な相関が認められた変数を用いてステップワイズ法 (変数増減法)による多変量解析も実施した. なお, 従属変数のうち, 血漿 UN および Cre 濃度に関しては, 共線性の問題が生じることが予測されたため, 多変量解析は従属変数から血漿 UN および Cre 濃度を含めた場合, そしてこれらを除外した場合の 2 通りを実施した. また, 受信者動作特性 (ROC) 曲線解析を用いて血漿 NT-proANP 濃度の軽度 GFR 低下 (ROC 1)および重度 GFR 低下 (ROC 2)に対する識別能を調査した. 本章に組み込んだイヌは, ROC 1 では正常群と GFR 低下群 (M-GFR 群+S-GFR 群)に分類し, ROC 2 では GFR が重度に低下していない群(正常群+ M-GFR 群)と S-GFR 群に分類した.  $P < 0.05$  を統計学的に有意と判断した.

### 4.3 結果

#### 組み込んだ症例の特徴

本章では、正常群に 19 頭、M-GFR 群に 26 頭、そして S-GFR 群に 14 頭のイヌが組み込まれた。このうち、6 頭は腫瘍性疾患の治療のために PCio が実施されたイヌであった（正常群、4 頭；M-GFR 群、1 頭；S-GFR 群、1 頭）。なお、これらの腫瘍性疾患のイヌを除外しても各変数の群間での比較、単変量解析、多変量解析および ROC 曲線解析の結果は、腫瘍性疾患のイヌを含めた場合と変わらなかった。そのため、以下に示す結果は全て腫瘍性疾患のイヌを含めたものである。各群の特徴および性別の内訳を表 4-1 に示す。各群間で血漿 NT-proANP 濃度に性差は認められなかった（全て  $P > 0.60$ ）。犬種の内訳は雑種 ( $n=6$ )、トイ・プードル ( $n=6$ )、ヨークシャー・テリア ( $n=5$ )、ミニチュア・ダックスフント ( $n=5$ )、シェットランド・シープドッグ ( $n=4$ )、チワワ ( $n=4$ )、フレンチ・ブルドック ( $n=3$ )、シー・ズー ( $n=3$ )、柴犬 ( $n=3$ )、ゴールデン・レトリバー ( $n=2$ )、ウェルシュ・コーギー ( $n=2$ )、ポメラニアン ( $n=2$ )、ワイアー・フォックス・テリア ( $n=2$ )、ジャック・ラッセル・テリア ( $n=2$ )、およびパピヨン ( $n=2$ )、そしてミニチュア・シュナウザー、マルチーズ、ボストン・テリア、ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア、スピッツ、ラブラドル・レトリバー、ブリュッセル・グリフォンおよびピレニアン・マスティフがそれぞれ 1 頭であった。

#### 変数の群間での比較

各群の変数の結果を表 4-1 に示す。

血漿 NT-proANP 濃度は、正常群および M-GFR 群の間で有意差は認められなかったのに対し ( $P=0.13$ )、正常群および M-GFR 群と比較して S-GFR 群で有意な上昇が認められた（それぞれ  $P < 0.01$ ；図 4-1）。

血漿 UN 濃度は、血漿 NT-proANP 濃度と同様に正常群および軽度 GFR 低下群の間で有意差は認められなかったが ( $P=0.99$ )、正常群および M-GFR 群と比較して重度 GFR 低下群で有意差が認められた（それぞれ  $P < 0.01$ ）。血漿 Cre 濃度は、全ての群間で有意差を示した（全て  $P < 0.01$ ）。血漿 Cl 濃度は、正常群と比較して M-GFR 群でのみ有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。USG は、正常群および S-GFR 群でのみ有意差を示した ( $P < 0.05$ )。その他の変数は、いずれの群間でも有意差を示さなかった。

表 4-1. 本章で組み込んだイヌの特徴

	正常群	M-GFR群	S-GFR群
症例数 (頭)	19	26	14
性別 (頭)			
雄	3	4	2
去勢雄	8	11	6
雌	3	2	2
避妊雌	5	9	4
体重 (kg)	6.6 (5.1–11.3)	6.4 (4.4–9.3)	6.6 (3.0–10.5)
年齢 (歳)	10.0 (8.3–10.3)	11.5 (9.3–13.0)	11.0 (8.8–13.4)
UN (mg/dL)	16.7 (11.1–22.1)	18.1 (12.1–28.1)	46.8 <sup>a,b</sup> (30.4–78.9)
Cre (mg/dL)	0.7 (0.4–0.9)	1.1 <sup>a</sup> (1.0–1.2)	1.6 <sup>a,b</sup> (1.2–2.0)
Na (mEq/L)	149 (147–150)	147 (144–149)	148 (141–152)
K (mEq/L)	4.3 (3.9–4.5)	4.1 (3.7–4.6)	4.4 (3.6–4.4)
Cl (mEq/L)	111 (107–117)	117 <sup>a</sup> (115–120)	116 (111–112)
Ca (mg/dL)	10.5 (10.4–10.9)	10.6 (10.3–11.0)	10.8 (10.6–11.3)
IP (mg/dL)	3.7 (3.0–4.0)	3.4 (2.7–3.9)	4.0 (3.6–4.7)
USG	1.025 (1.017–1.034)	1.027 (1.013–1.032)	1.020 <sup>b</sup> (1.015–1.026)
PCio (mL/min/kg)	4.85 (3.04–5.58)	1.43 <sup>a</sup> (1.21–1.61)	0.74 <sup>a,b</sup> (0.54–0.84)
NT-proANP (pg/mL)	6243 (3324–9046)	9119 (5708–10833)	16251 <sup>a,b</sup> (11585–33719)

(表 4-1 注釈)

データは中央値 (四分位範囲) で示した. M-GFR, 軽度 GFR 低下; S-GFR, 重度 GFR 低下; GFR, 糸球体濾過量; UN, 尿素窒素; Cre, クレアチニン; Na, ナトリウム; K, カリウム; Cl, クロール; Ca, カルシウム; IP, リン; USG, 尿比重, PCio, 血漿イオヘキソール・クリアランス; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; a,  $P < 0.05$  vs 正常群; b,  $P < 0.05$  vs M-GFR 群.

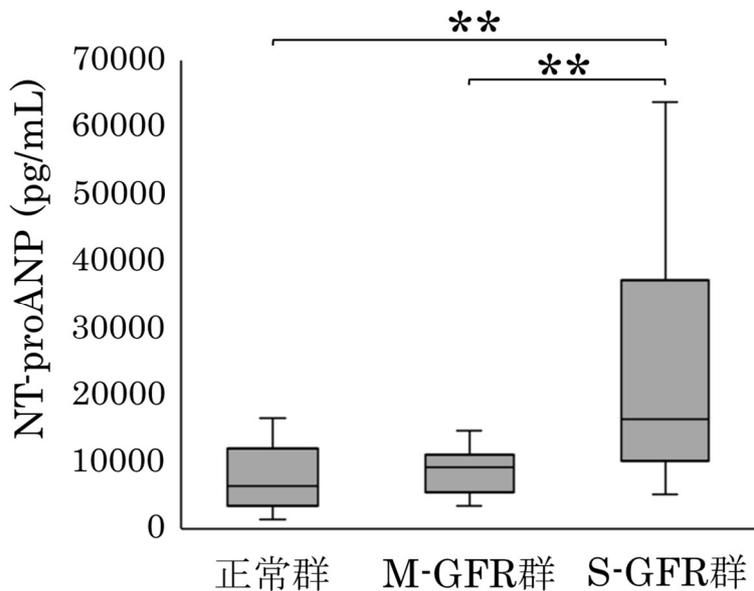


図 4-1. 血漿 NT-proANP 濃度の群間比較

箱は四分位範囲を, そして箱の中央線は中央値を示す. ひげは上下四分位範囲の 1.5 倍を超えた値を示している. M-GFR, 軽度 GFR 低下; S-GFR, 重度 GFR 低下; GFR, 糸球体濾過量; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; \*\*,  $P < 0.01$ .

## 各変数の相関性

単変量解析では、血漿 NT-proANP 濃度と血漿 UN 濃度 ( $r=0.339$ ), 血漿 Cre 濃度 ( $r=0.358$ )および PCio ( $r=-0.309$ )が (それぞれ  $P<0.01$ ; 図 4-2), そして PCio と年齢 ( $r=-0.335$ ), 血漿 NT-proANP 濃度 ( $r=-0.309$ ), 血漿 UN 濃度 ( $r=-0.269$ ), 血漿 Cre 濃度 ( $r=-0.465$ ), 血漿 Cl濃度 ( $r=-0.211$ )およびUSG ( $r=0.255$ )が有意に相関した (年齢, NT-proANP, UN および Cre で  $P<0.01$ ; 年齢, Cl および USG で  $P<0.05$ ; 図 4-3).

単変量解析で PCio と有意に相関した変数を用いて実施した多変量解析の結果を表 4-2 および 4-3 に示す. 従属変数に血漿 UN および Cre 濃度を含めた多変量解析では, PCio と有意に相関する変数として, 血漿 Cre 濃度が選択された ( $r=-0.553$ ). 従属変数から血漿 UN および Cre 濃度を除外した多変量解析では, PCio に独立して影響する因子として血漿 Cl 濃度が選択された ( $r=-0.330$ ).

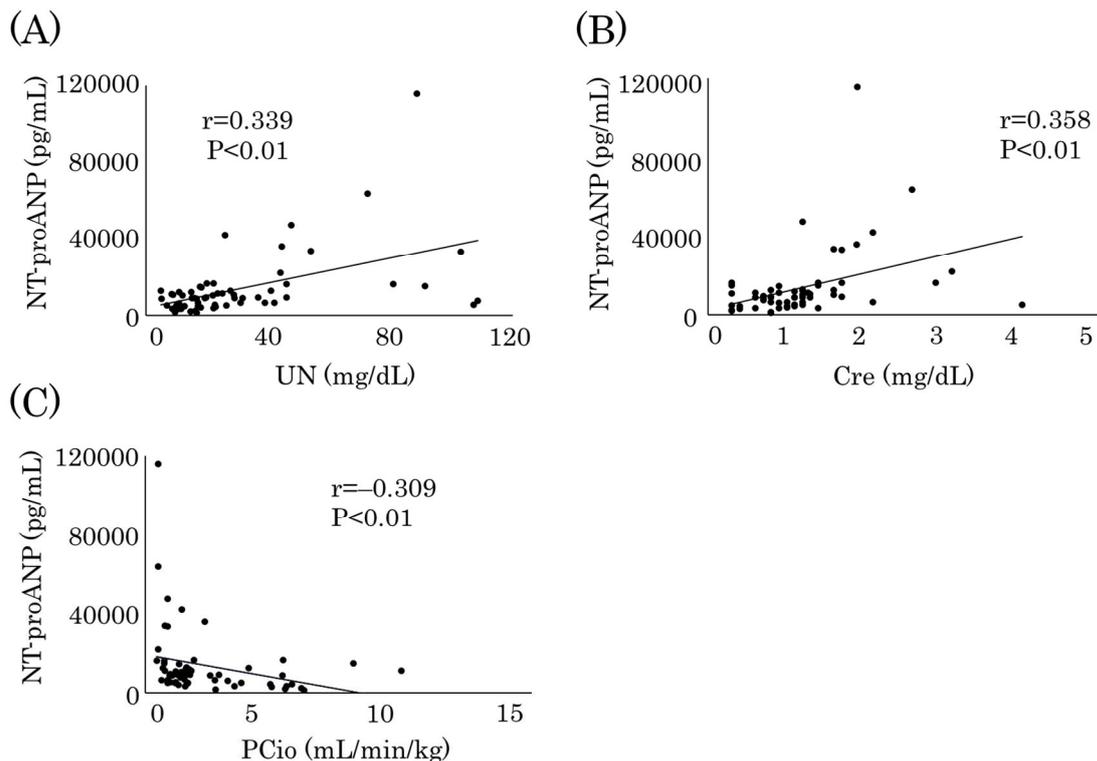


図 4-2. 血漿 NT-proANP 濃度と有意に相関した各変数の散布図

A, vs 血漿 UN 濃度; B, vs 血漿 Cre 濃度; C, vs PCio. NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; UN, 尿素窒素; Cre, クレアチニン; PCio, 血漿イオヘキソール・クリアランス.

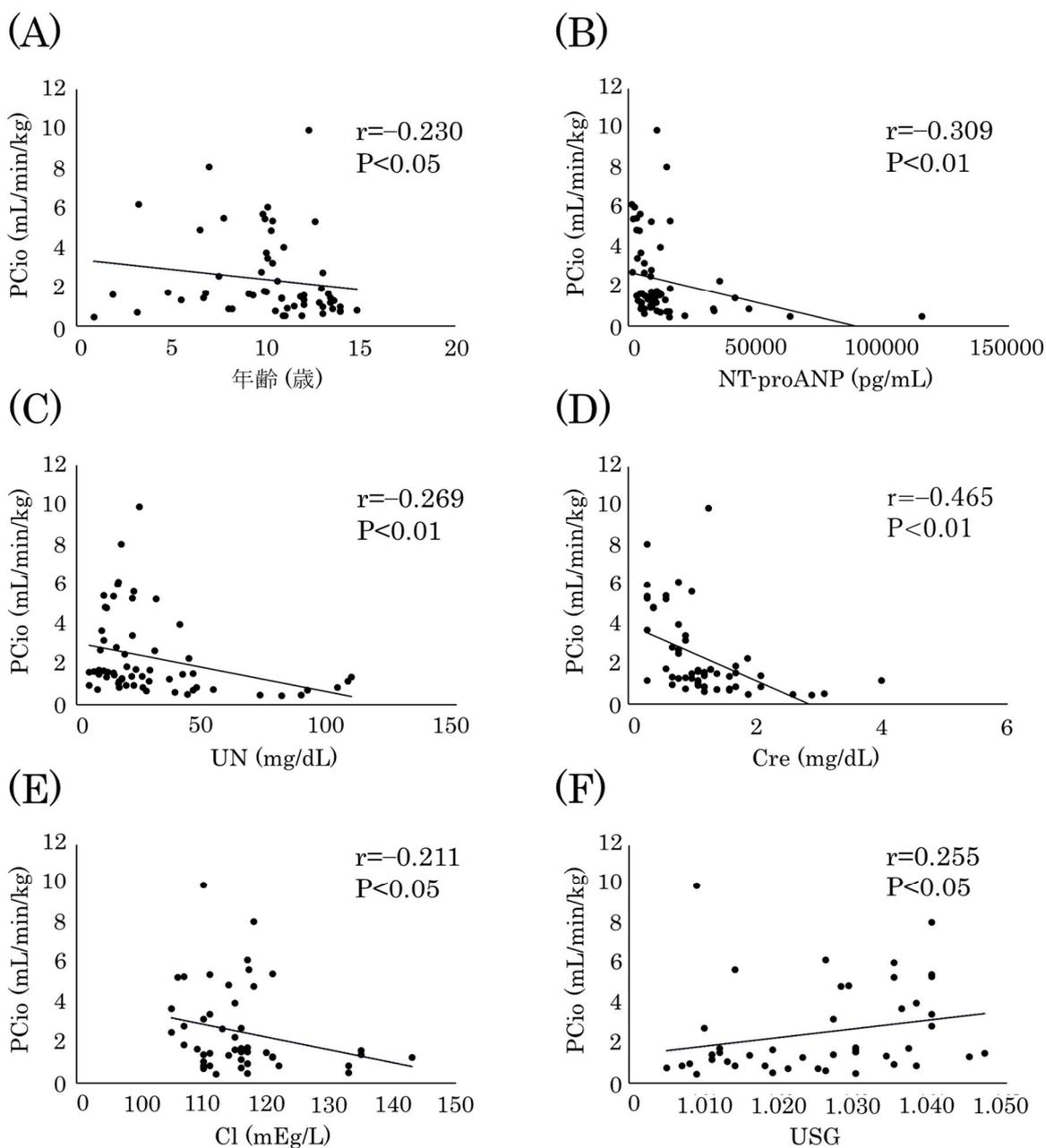


図 4-3. PCio と有意に相関した各変数の散布図

A, vs 年齢; B, vs 血漿 NT-proANP 濃度; C, vs 血漿 UN 濃度; D, vs 血漿 Cre 濃度; E, vs 血漿 Cl 濃度; F, vs USG. PCio, 血漿イオヘキソール・クリアランス; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; UN, 尿素窒素; Cre, クレアチニン; Cl, クロール; USG, 尿比重.

表 4-2. 多変量解析の結果 (従属変数に UN および Cre 含む)

従属変数	独立変数	偏相関係数	P値
PCio	Cre	-0.553	<0.01

PCio, 血漿イオヘキソール・クリアランス; UN, 尿素窒素; Cre, クレアチニン.

表 4-3. 多変量解析の結果 (従属変数から UN および Cre を除外)

従属変数	独立変数	偏相関係数	P値
PCio	Cl	-0.330	<0.05

PCio, 血漿イオヘキソール・クリアランス; UN, 尿素窒素; Cre, クレアチニン; Cl, クロール.

### 血漿 NT-proANP 濃度の GFR 低下に対する識別能

ROC 曲線解析の結果を図 4-4 および表 4-4 に示す. 軽度の GFR 低下に対する識別能 (カットオフ値 6466 pg/mL, AUC 0.69, 感度 80.0 %, 特異度 57.1 %)と比較して, 重度の GFR 低下に対する識別能 (カットオフ値 12683 pg/mL, AUC 0.80, 感度 85.1 %, 特異度 71.4 %)の方が優れていた.

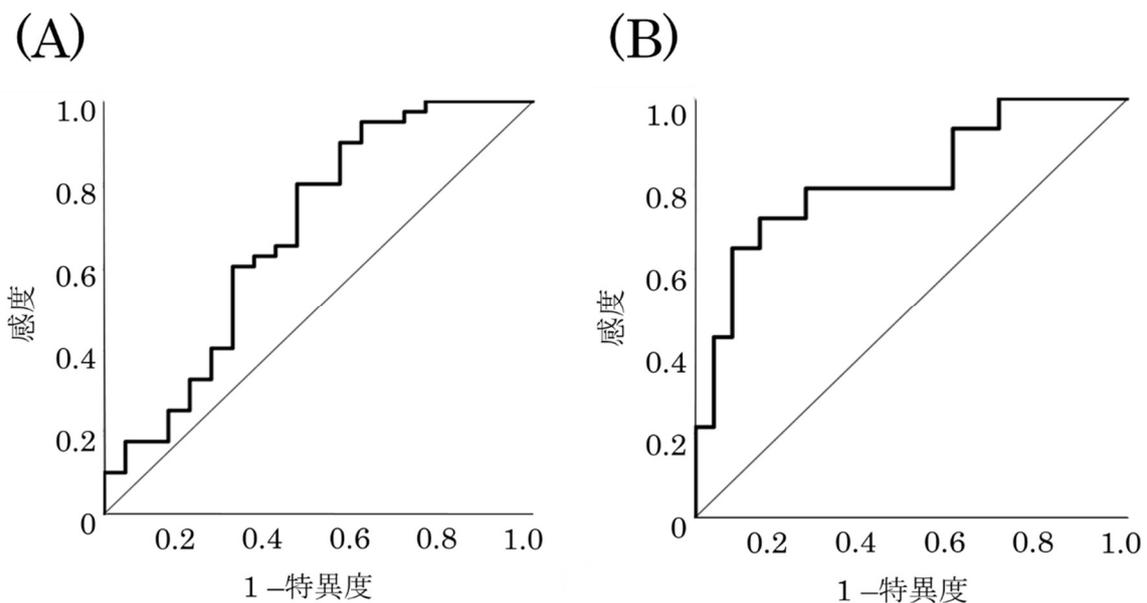


図 4-4. ROC 曲線

A, GFR 低下に対する ROC 曲線; B, 重度 GFR 低下に対する ROC 曲線. GFR, 糸球体濾過量; ROC, 受信者動作特性.

表 4-4. ROC 曲線解析の結果

	ROC 1	ROC 2
カットオフ値	6466 pg/mL	12683 pg/mL
AUC	0.69	0.80
95% CI	0.54–0.85	0.66–0.95
感度 (%)	80.0	71.4
95% CI	0.65–0.89	0.45–0.88
特異度 (%)	57.1	85.1
95% CI	0.36–0.75	0.72–0.92
陽性的中率 (%)	78.0	58.8
95% CI	0.63–0.88	0.36–0.78
陰性的中率 (%)	60.0	90.9
95% CI	0.38–0.78	0.78–0.96
尤度比	1.86	4.79
95% CI	1.11–3.13	2.24–10.25

ROC 1, GFR 低下に対する識別能; ROC 2, 重度 GFR 低下に対する識別能. GFR, 糸球体濾過量; ROC, 受信者動作特性 CI, 信頼区間; AUC, 曲線下面積.

#### 4.4 考察

GFR は、イオヘキソールを用いた血漿クリアランス法によって直接的に測定することが可能である。そのため、獣医療では PCio 試験は腎機能を評価する最も利用されている手法の1つとされている[74]。本章では、血漿 NT-proANP 濃度は GFR 正常群と比較して重度 GFR 低下群で有意に上昇した。また、単変量解析では血漿 NT-proANP 濃度は PCio と負の相関を示した。このことから、血漿 NT-proANP 濃度は重度な GFR の低下に伴い上昇すると考えられる。

粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) のイヌでは、僧帽弁逆流によって左房圧が上昇し、それに伴い左房拡大が進行する[12]。NT-proANP は心房の伸展に伴い、生理活性物質である ANP と共に血中へ放出されることから、イヌでは、血漿 NT-proANP 濃度は MMVD の進行に伴い上昇することが報告されている[43,112]。しかし、本章では、心疾患のイヌを除外した。このことから、本章で血漿 NT-proANP 濃度が重度 GFR 低下群のイヌで有意に上昇した理由として、NT-proANP の排泄経路が挙げられる。ヒトでは、NT-proANP の 17 %が腎臓から排泄されることが報告されている[104]。イヌではこの点は明らかにされていないが、本章の結果を踏まえると、イヌでも NT-proANP の一部は腎臓から排泄されていると思われる。また、血漿 NT-proANP 濃度は GFR 正常群と軽度 GFR 群との間で有意差が認められなかったこと、多変量解析にて PCio の独立変数として選択されなかったこと、そして ROC 曲線の解析結果から、血漿 NT-proANP 濃度はイヌでも腎臓からの排泄は僅かであり、GFR が重度に低下した段階で上昇すると思われた。このことを裏付けるように、GFR が 25 %に低下するまで異常値を示さないといわれている血漿 Cre 濃度とも血漿 NT-proANP 濃度は有意に相関した[34,37]。ヒトでは血漿 ANP 濃度は加齢に伴い心房の伸展性が増加して上昇すること、そして血漿 NT-proANP 濃度はエストロジェンの影響を受けるため、女性の方が高値を示すことが報告されている[23,53]。しかし、本章では血漿 NT-proANP 濃度は年齢および体重と相関を示さず、性差も認められなかった。そのため、本章では体重や性別といったシグナルメントは結果に影響していないと考えられる。

本章で示された重度の GFR 低下を識別する血漿 NT-proANP 濃度のカットオフ値は 12683 pg/mL であった。過去の報告では、うっ血性心不全のイヌで設定されたカットオフ値は 1200 pmol/L (12550 pg/mL; 分子量 10466 で計算)であり、本章で設定したカッ

トオフ値をやや下回る[13]. 心臓および腎臓は体液調節において密接な関係にあり、一方の臓器の障害は他方の臓器の機能低下を引き起こすことから、このような病態を心腎症候群 (CRS)と呼ぶ[100]. イヌでも心疾患に起因する二次性腎不全が CRS の1つとして知られている[106]. MMVD のイヌでは、心拍出量が減少し、GFR の低下および高窒素血症の悪化を招くことが知られている[79]. 本章の結果から、心疾患のイヌで血漿 NT-proANP 濃度が高値を示すイヌのうち、特に12683 pg/mLを超えるような症例では、心疾患が悪化した可能性に加え、進行した慢性腎臓病を併発しているか、あるいは既に CRS に伴う重度の GFR の低下が生じている可能性も考慮すべきと考えられた. 血漿 NT-proANP 濃度が高値を示すヒトでは、10 年後に心血管疾患に罹患するリスクが高いことが報告されている[101]. そのため、イヌでも今後血漿 NT-proANP 濃度が CRS の予測因子または予後指標になる可能性がある. しかし、本章では心疾患のイヌを除外しているため、CRS および血漿 NT-proANP 濃度の関係性に関しては、今後心疾患および慢性腎臓病を合併した症例を含めた更なる調査が必要と考える.

本章では、PCio が正常にも関わらず、重度の GFR 低下に対するカットオフ値 (12683 pg/mL)を超える症例が 3/21 頭存在した. その 3 頭中 2 頭は悪性腫瘍 (メラノーマまたは肺癌)に罹患していた. イヌでは、呼吸器疾患およびまたは低酸素症に起因する肺高血圧症が存在し、肺腺癌も肺動脈性肺高血圧症を引き起こすことがある[97]. また、ヒトでは血漿 ANP 濃度は慢性肺疾患で上昇することが報告されており、この原因の1つとして肺高血圧症が挙げられる[6]. 本章では問診および身体診察から心疾患を除外したが、肺癌の症例は臨床徴候が認められず、心雑音は聴取されなかったものの、肺高血圧症に伴い右室および右房圧が上昇し、右房拡大に伴い血漿 NT-proANP 濃度が上昇していたのかもしれない. また、近年ヒト医療では ANP は血管保護による癌転移予防効果があると考えられている[82]. メラノーマに罹患したヒトでは、ANP 製剤を投与することで、内皮細胞が炎症によって活性化する際に発現される E セクレチンの発現増加が抑制される [80,81]. 実際に、腫瘍性疾患に罹患した症例で血漿 NT-proANP 濃度が上昇したという報告は、ヒトおよびイヌともに存在しない. そのため、本章では腫瘍性疾患を除外しなかった. しかし、本章の結果を踏まえると、メラノーマの症例に関しては、腫瘍の発現によって血漿 NT-proANP 濃度が上昇した可能性も考えられた. GFR 正常群で血漿 NT-proANP 濃度が 12683 pg/mL を超えていた 3 頭のうち、上記以外の 1 頭に関

しては、血漿 NT-proANP 濃度が高値を示した原因を明らかにすることができなかった。しかし、年齢が 12 歳齢と高齢であったことから、本章では年齢および血漿 NT-proANP 濃度は相関しなかったものの、過去のヒトの報告を踏まえると加齢が関係しているかもしれない[23]。

本章では PCio との共線性を考慮して血漿 UN および Cre 濃度を従属変数から除外した多変量解析も実施した。その結果、PCio と関連する因子として血漿 Cl 濃度が選択された。本章で用いた症例のほとんどで血液ガス検査を実施していなかったが、血漿 Cl 濃度が PCio と相関した理由として、代謝性アシドーシスが関係していると考えられる。二酸化炭素分圧が減少することで十分に代償された軽度の代謝性アシドーシスは安定した慢性腎臓病のヒトで一般的に認められる。GFR の低下に伴い重炭酸濃度が低下し、リンや硫酸といったアニオンが蓄積していく状態では、その経過の早期には高 Cl 血症かつ正常なアニオンギャップを示し、経過の後期では正常な血漿 Cl 濃度かつ高アニオンギャップを示す[21]。本章では、血漿 IP 濃度は GFR の低下に伴い上昇傾向を示したが、いずれの群間でも有意差を示さなかった。このことから、本章で組み込まれた症例の多くが高 Cl 血症かつ正常なアニオンギャップであったことが予想され、その結果、PCio と血漿 Cl 濃度が有意に逆相関したと思われた。

本章にはいくつかの制限が存在する。第 1 に、本章の研究は回顧的研究であり、血圧および血液ガス検査の結果を変数に含めることができなかった。そのため、本章で血漿 NT-proANP 濃度が高値を示した腎外性要因として血圧が含まれていたかを調査することができず、そして組み込まれたイヌが実際に代謝性アシドーシスを示していたかを明らかにすることができなかった。ラットの過去の報告では、血圧と血漿 NT-proANP 濃度は相関することが報告されており[29]、そして一部の慢性腎臓病のイヌでは高血圧を示すことが知られている[124]。GFR が低下したイヌでの高血圧と血漿 NT-proANP 濃度の関係性については今後検討が必要である。第 2 に、本章では胸部 X 線検査および心エコー図検査のデータを取得することが出来なかったため、心疾患の除外は問診および身体診察の結果を用いた。無徴候性の拡張型心筋症や軽度な肺高血圧症といった問診および身体診察で異常が検出されないイヌが含まれていた可能性は残る。

#### 4.5 小括

本章では、PCio 試験を実施したイヌで血漿 NT-proANP 濃度と GFR の関連性を調査した。結果として、血漿 NT-proANP 濃度は正常群および軽度 GFR 低下群と比較して重度 GFR 低下群で有意に上昇した。このことから、血漿 NT-proANP 濃度は GFR の影響を受けるが、この影響は GFR が重度に低下した場合のみであり、軽度な GFR の低下では血漿 NT-proANP 濃度はほとんど影響されないと考えられた。重度の GFR 低下を検出するための血漿 NT-proANP 濃度のカットオフ値は 12683 pg/mL であった。このカットオフ値は過去のうっ血性心不全を示すイヌの報告で設定したカットオフ値を上回っており、心疾患のイヌで血漿 NT-proANP 濃度が 12683 pg/mL を超えるようなイヌでは単純に進行した慢性腎臓病を併発しているか、あるいは既に CRS による重度の GFR 低下が生じている可能性も考慮すべきと思われた。また、本章では、GFR に問題がないにも関わらず、血漿 NT-proANP 濃度が 12683 pg/mL を超えるイヌが 3 頭いた。うち、2 頭はメラノーマまたは肺癌に罹患していたことから、血漿 NT-proANP 濃度は心疾患および慢性腎臓病以外でも腫瘍性疾患によって上昇する可能性が考えられた。こちらに関しては今後更なる検討が必要である。

## 第5章

粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌでの  
血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム  
利尿ペプチド濃度および3種類の  
心臓バイオマーカーの病態に対する  
識別能の比較

## 5.1 緒言

粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD)は、イヌの後天性心疾患の中で最も多い疾患である[12,17]. MMVDの臨床徴候として、運動不耐性や肺水腫による呼吸困難などが挙げられる[33,38,44]. MMVDは不可逆的に進行することから、病態の進行を定期的にモニタリングする必要がある. 心臓バイオマーカー (CB)検査は、胸部 X 線検査および心エコー図検査と比較して、測定に特別な訓練を必要としない簡易的検査である. CBの1つである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)は、心房筋の伸展に伴い心房から放出される生理活性物質である[42,58,108]. 血漿 ANP 濃度は、MMVDの重症度に伴い上昇することが報告されており、MMVDのイヌのCBとして使用されている[28]. しかし、血漿 ANP 濃度は半減期が1-4分と短く、血中での安定性に欠ける[102,107]. いっぽうで、N末端プロ ANP (NT-proANP)は ANP と等モル量で血中に放出される非生理活性物質であり、半減期は ANP の10倍と長く、血中での安定性に優れている[3,68,112,123,125]. MMVDの臨床徴候が認められるイヌでは、血漿 NT-proANP 濃度は血漿 ANP 濃度と比較してうっ血性心不全 (CHF)の識別能において高い曲線下面積 (AUC)を示した[43]. しかし、MMVDの治療を開始すべきとされている無徴候かつ心拡大を示すイヌ (アメリカ獣医内科学会[ACVIM]が発表した最新の MMVD に関するガイドラインではステージ B2 に該当)に対する血漿 NT-proANP 濃度の識別能を評価した研究はない[55]. MMVDのイヌでは、血漿 ANP 濃度よりも血漿 NT-proANP 濃度の方が心拡大を評価するのに適したCBとなるかもしれない.

MMVDのイヌでは、血漿 ANP および NT-proANP 濃度以外の臨床的に有用なCBとして、N末端プロ B型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)および心筋トロポニン I (cTnI)濃度が挙げられる[20,27,31,64]. NT-proBNPは、主に心室筋の伸展に伴い血中へ放出され、そして cTnI は心筋細胞の障害に伴い血中に放出される[56]. そのため、これらのCBの血中濃度がMMVDのイヌで上昇するメカニズムは、血漿中 ANP および NT-proANP 濃度が上昇するメカニズムとは異なる. 特に、血漿 NT-proBNP 濃度は血漿 NT-proANP 濃度と同様に血中での半減期が長く、血漿 cTnI 濃度とは異なり、心疾患のイヌでは心筋細胞の障害とは関係なく上昇することが知られている[87]. また、ANPは短時間の刺激で急速に分泌されるのに対し、BNPは長時間の刺激で増加することが報告されている[41,114]. 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度では、MMVDのイヌに

においてその血中濃度が上昇し始めるタイミングが異なる可能性がある。CHF を発現する前の MMVD のイヌを用いた研究で、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の診断的有用性が比較されているが[112]、この研究では対象となった犬種がキャバリア・キング・チャールズ・スパニエルに限定されており、様々な犬種を対象としたこれら CB の大規模な比較研究は実施されていない。また、MMVD のイヌでは血漿 NT-proANP 濃度および上述した 3 種類の CB の心拡大および CHF の識別能を比較した研究は存在しない。MMVD のイヌで血漿 NT-proANP 濃度と分泌機序が異なる他の CB を比較することは、MMVD のステージの病態把握に適した CB を選択する上で重要であると考えられる。

したがって本章では、MMVD に罹患したイヌでの血漿 NT-proANP, NT-proBNP, ANP および cTnI 濃度の特徴、そして心拡大および CHF に対する識別能を評価および比較することを目的とした。なお、本章の内容は既に *Journal of Veterinary Medical Science* に公表済みである[83]。

## 5.2 材料および方法

### 供試動物

本章では、多施設前向き横断研究を採用し、日本獣医生命科学大学附属動物医療センター循環器科および外部の 7 施設から症例を組み込んだ。対象となる症例は、2018 年 6 月から 2019 年 11 月の間に受診したイヌとした。本章では、健康診断の一環として、あるいは MMVD の治療に伴う有害事象（高窒素血症、電解質異常など）を確認するために採血が必要であったイヌから血液を採取した。しかし、一部のイヌでは本章の研究のためだけに血液を採取する必要があったため、本研究は本学生命倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号 R2-2）。また、全てのイヌの家族からインフォームド・コンセントを得た上で検体収集を実施した。

組み込んだイヌは正常群または MMVD 群に分類した。かかりつけ医での胸部 X 線検査にて心拡大が疑われ、セカンド・オピニオンとして心臓の検査（問診、身体診察、血液化学検査、心電図検査、胸部 X 線検査、心エコー図検査および血圧測定）を実施したイヌのうち、心雑音が聴取されず、画像検査にて心拡大所見が認められなかったイヌは正常心と判断し、正常群に組み込んだ。本章では、心エコー図検査にて僧帽弁の粘液腫様変性による肥厚、そしてモザイクシグナルを伴う僧帽弁逆流が認められたイヌを MMVD

と診断した。MMVD 群のイヌは、ACVIM の MMVD に関するガイドラインに従い、ステージ B1, B2, C および D に分類した[55]。なお、心臓に器質的異常はないものの、MMVD の発現リスクが高い犬種は本来であればステージ A に分類されるが、本章ではステージ A に該当するイヌは正常群に含めた。CHF を伴わない MMVD のイヌのうち、心拡大が認められないイヌをステージ B1、そして心拡大を伴うイヌをステージ B2 とした。心拡大の診断基準は、心雑音のグレード $\geq$ Levine3/6かつ左心拡大の所見（椎骨心臓サイズ[VHS] $>10.5$ 、左房内径大動脈根内径比[LA/Ao] $\geq 1.6$  および体重で標準化した拡張末期左室内径[LVIDdN] $\geq 1.7$ )の条件を全て満たした場合、あるいは椎骨左房サイズ(VLAS) $\geq 3$  が認められる場合とした[55]。過去または現在に問診、身体診察および画像検査の結果から、CHF と診断されたイヌをステージ C に分類した。本章では心不全徴候を緩和すると考えられる薬剤の一般的な用量と共に、フロセミドの 1 日の総投与量が $\geq 8\text{mg/kg}$ 、あるいはトラセミドの 1 日の総投与量が $\geq 0.6\text{mg/kg}$  必要とするイヌをステージ D に分類した[55,88]。また、本章ではステージ B2 以上かつ三尖弁逆流血流速 (TR jet) $\geq 3.0\text{m/秒}$ およびまたは肺動脈逆流血流速 (PR jet) $\geq 2.5\text{m/秒}$ のイヌを後毛細血管性肺高血圧症と診断した[97]。

#### 除外基準

以下の条件を 1 つでも満たしたイヌは、本研究から除外した。

- ・問診、身体診察および胸部 X 線検査の結果から呼吸器疾患（気管虚脱、気管支虚脱および肺炎など）が疑われた症例。
- ・MMVD に起因しない前毛細血管性肺高血圧症の症例；本章では、軽度の MMVD (ACVIM ステージ B2 未満)かつ TR jet $\geq 3.0\text{m/秒}$ およびまたは PR jet $\geq 2.5\text{m/秒}$ のイヌを前毛細血管性肺高血圧症と診断した[97]。
- ・問診、身体診察および画像検査の結果に基づき、慢性腎臓病が疑われた症例、あるいは血漿クレアチニン (Cre)濃度 $\geq 1.4$ の症例；なお、血漿 Cre 濃度が正常範囲内であっても超音波検査にて腎臓の構造に異常が認められた症例は除外した[47]。
- ・心電図検査にて心房細動、心室頻拍および第 3 度房室ブロックなどが認められた症例；ただし、洞不整脈、洞頻脈、そして散発的な心室性または上室性期外収縮は血行動態を変化させないため、各 CB の結果は影響しないと判断し、本章の検討に組み込んだ。

- ・正常群または既に MMVD に対する治療が実施されていたステージ B1 の症例.
- ・上記以外の疾患に罹患している症例, あるいは MMVD 以外の治療が実施されていた症例; ただし, 血行動態に影響しない良性の皮膚腫瘍, 軽度の口腔疾患および軽度の膝蓋骨脱臼が認められたイヌに関しては, 各 CB の結果に影響しないと判断し, 本章での検討に含めた.

#### 評価項目

評価項目は, 年齢, 体重, 心拍数, 呼吸数, 心雑音のグレード, VHS, VLAS, 僧帽弁逆流血流速 (MR jet), TR jet, PR jet, LA/Ao, LVIDd, LVIDdN, 血漿 NT-proANP, NT-proBNP, ANP および cTnI 濃度とした.

#### 胸部 X 線検査

イヌを右側横臥位または腹臥位に保定して, 右側面および背腹面の X 線画像を得た. VHS および VLAS は, 過去の報告に従って測定した[18,70].

発咳が認められる, あるいは発咳誘発試験 (喉頭圧迫試験)が陽性であったイヌでは, 吸気時だけでなく呼気時にも胸部 X 線撮影を実施した. 吸気時の気管または気管支が呼気時の気管または気管支の 50 %以上狭窄していた場合, 気管または気管支虚脱と診断し, そのイヌは本章の検討から除外した[77].

#### 心エコー図検査

第 3 章と同様に実施した.

#### CB の測定

血液検体をイヌの頸静脈から採取し, EDTA-2K (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 福島)およびアプロチニンを含む EDTA-2Na (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 福島)にそれぞれ 2 mL 分注し, いずれも 4 °C で 1187 g, 5 分間の条件下で遠心分離した. EDTA-2K から得られた血漿検体は, 血漿 NT-proANP, NT-proBNP および cTnI 濃度を測定するために, そして EDTA-2Na から得られた血漿検体は, 血漿 cTnI 濃度を測定するために-80 °C で凍結保存し, これらの測定は外部検査機関 (NT-proANP, 共立製薬株式会社, 東京; NT-proBNP; ANP および cTnI, 富士フィルム VET システムズ株

式会社,東京)に測定を委託した.

血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の測定は, 第 2 章および第 3 章と同様の方法で測定した. 血漿 ANP および cTnI 濃度は, 化学発光酵素免疫測定法を用いて測定した. 血漿 ANP および cTnI 濃度の検出限界値はそれぞれ 2000 pg/mL および 50 ng/mL であり, この値を上回った場合は蒸留水で希釈した.

#### CB の識別能の評価

各 CB の心拡大 (イベント 1) の識別能, そして CHF (イベント 2) の識別能を評価した. イベント 1 では, MMVD 群のイヌのうち, ステージ B2 以上を心拡大群に, そしてステージ B1 のイヌを非心拡大群に分類した. イベント 2 では, 問診, 身体診察, 胸部 X 線検査および心エコー図検査にて肺水腫または胸水が確認されたイヌを CHF 群に, それ以外の MMVD 群のイヌを非 CHF 群に分類した.

#### 統計学的解析

統計解析は, 市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24 (日本 IBM 株式会社, 東京)を用いて実施した. データの正規性は Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した. 各変数のステージ間 (正常群, ACVIM ステージ B1, B2, C および D) の比較には, Kruskal-Wallis 検定および事後検定として Steel-Dwass 検定を用いた. 各 CB とその他の変数との相関性は, Spearman の順位相関係数を用いて単変量解析を実施した. 単変量解析にて CB と有意な相関が認められた変数を用いて変数増減法 (ステップワイズ法) による多変量解析を実施し, 各 CB に独立して影響する因子を評価した. 受信者動作特性 (ROC) 曲線解析を用いて, 各 CB のイベント 1 および 2 の識別能 (AUC, 感度および特異度を用いて評価) を検証した. またカットオフ値は, 作製した ROC 曲線で左上に最も近い点から求めた. さらに, AUC による 4 種類の CB の比較は, 以前に報告された方法を用いて実施し, 得られた P 値は Bonferroni 法で補正した[39]. P 値<0.05 を統計的に有意とした.

### 5.3 結果

#### 組み込んだ症例の特徴

本章では、合計 105 頭のイヌが組み込まれた。正常群 (36 頭)では、年齢の中央値は 6.0 (四分位範囲, 1.1–10.0)歳で、そして体重は 4.60 (3.50–7.15) kg であった。MMVD 群 (69 頭; ステージ B1, 34 頭; B2, 14 頭; C, 14 頭; D, 7 頭)では、年齢の中央値は 10.0 (8.0–14.0)歳で、そして体重は 4.20 (3.30–6.50)kg であった。犬種の内訳を表 5–1 に示す。本章では、12 頭のイヌが後毛細血管性肺高血圧症と診断された (B2, n=2[14.2 %]; C, n=5[35.7 %]; D, n=5[71.4 %])。また、ステージ C および D に分類されたイヌのうち、一部のイヌは CHF を発現していた。しかし、ステージ C および D の CHF を発現していたイヌ (n=8)および発現していなかったイヌ (n=13)との間では、各 CB の血中濃度に有意差は認められなかった (NT-proANP, P=0.88; NT-proBNP, P=0.44; ANP, P=0.68; cTnI, P=0.14)。

表 5–1. 犬種の内訳

	正常群	MMVD群
キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル	0	10
シー・ズー	2	0
柴犬	2	1
ダックスフンド	3	6
チワワ	5	20
トイ・プードル	10	12
パピヨン	0	4
ビーグル	6	0
ミニチュア・シュナウザー	1	5
その他	7	11

値は全て頭数。MMVD, 粘液腫様変性性僧帽弁疾患。

#### 各変数のステージ間での比較

血漿 cTnI 濃度を除く 3 種類の CB は、正常群に対してステージ B1, B2, C および D で有意に高値だった (それぞれ  $P < 0.01$ ; 図 5-1 および表 5-2). また、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度はステージ B1 と C との間で、そして血漿 ANP 濃度はステージ B1 と D との間で有意差が認められた (それぞれ  $P < 0.05$ ; 図 5-2A-C). 血漿 cTnI 濃度は、正常群に対してステージ B1 および D で有意に高値だった (それぞれ  $P < 0.01$ ; 図 5-2D).

CB 以外の変数の比較では、LA/Ao のみが正常群に対してステージ B1, B2, C および D 間で有意差を示した (それぞれ  $P < 0.01$ ). また、LVIDd は正常群とステージ B2 および D, そしてステージ B1 とステージ B2 および D の間で有意差を示し、LVIDdN は正常群とステージ B1, B2 および D, そしてステージ B1 ステージ B2 および D の間で有意差を示した (それぞれ  $P < 0.05$ ).

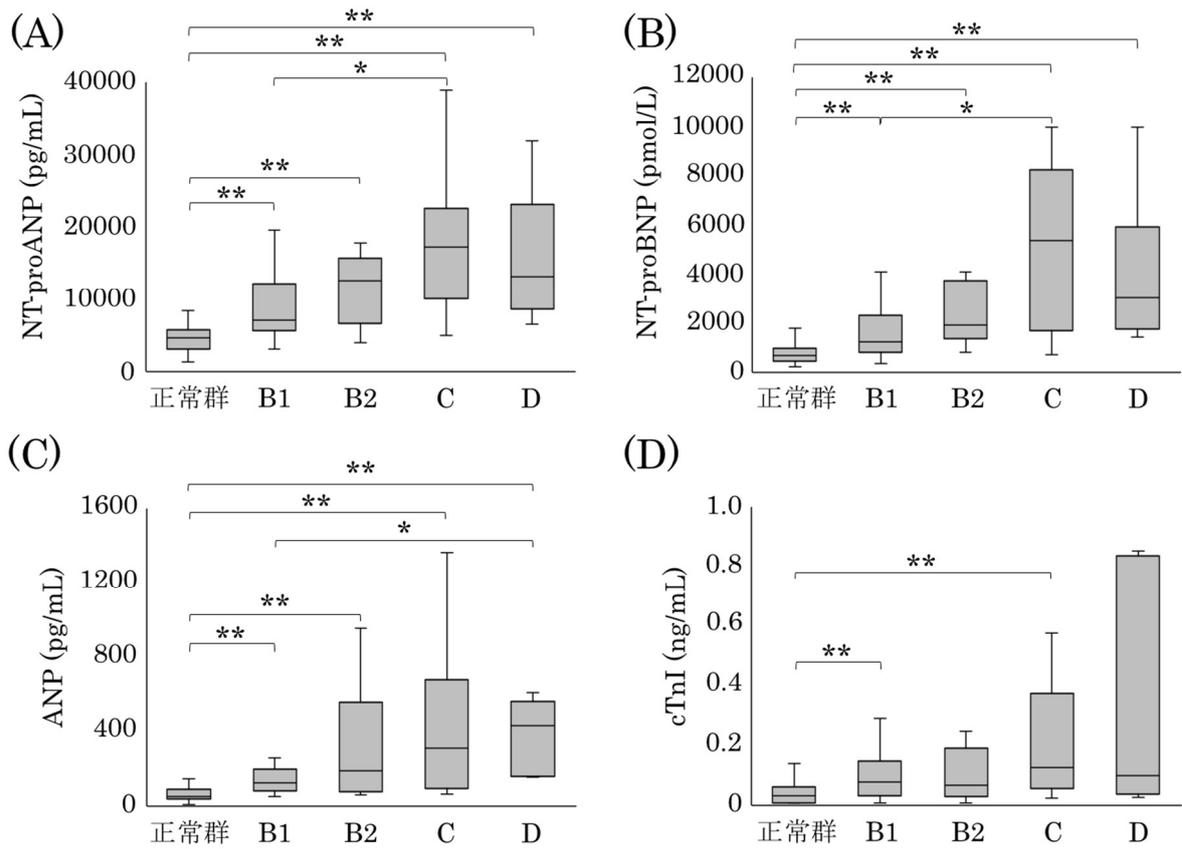


図 5-1. CB の各ステージ間での比較

箱は四分位範囲を、そして箱の中央線は中央値を示す。ひげは上下四分位範囲の 1.5 倍を超えた値を示す。A, 血漿 NT-proANP 濃度; B, 血漿 NT-proBNP 濃度; C, 血漿 ANP 濃度; D, 血漿 cTnI 濃度. NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; cTnI, 心筋トロポニン I; \*\*, P<0.01; \*, P<0.05.

表 5-2. 本章で組み込んだイヌの特徴

	正常群	MMVD群			
		B1	B2	C	D
症例数 (頭)	36	34	14	14	7
性別 (頭)					
雄	8	5	3	0	1
雌	9	2	0	2	0
去勢雄	13	10	7	5	1
避妊雌	6	17	4	7	5
年齢 (歳)	6.0 (1.1–10.0)	10.0 <sup>a</sup> (8.5–14.0)	10.0 <sup>a</sup> (8.0–14.0)	10.5 (6.7–14.0)	7.2 <sup>b</sup> (5.6–14.0)
体重 (kg)	4.60 (3.50–7.15)	4.10 (3.29–6.54)	5.20 (3.72–9.42)	4.05 (2.53–4.91)	4.55 (3.07–6.38)
心拍数 (回/分)	120 (102–150)	130 (120–160)	140 (130–150)	140 (120–171)	138 (116–158)
呼吸数 (回/分)	41 (32–48)	40 (36–57)	42 (36–52)	40 (30–82)	44 (33–58)
心雑音のグレード (6段階)	–	3 (2–4)	3 (3–5)	4 <sup>b</sup> (3–4)	5 <sup>b,c</sup> (5–6)
VHS (v)	9.8 (9.5–10.1)	10.3 (9.7–10.6)	11.5 <sup>a,b</sup> (10.9–12.0)	11.2 <sup>a,b</sup> (11.0–12.5)	12.5 <sup>a,b</sup> (11.0–12.8)
VLAS (v)	1.9 (1.7–2.0)	2.2 <sup>a</sup> (2.0–2.4)	2.6 <sup>a,b</sup> (2.2–3.0)	3.0 <sup>a,b</sup> (2.5–3.6)	2.7 (1.8–2.8)
MR jet (m/秒)	–	5.48 <sup>a</sup> (5.04–5.84)	5.95 <sup>a,b</sup> (5.56–6.25)	5.06 <sup>c</sup> (4.75–5.24)	5.08 <sup>c</sup> (4.70–5.43)
TR jet (m/秒)	–	0 (0–1.95)	1.31 (0–2.88)	1.44 (0–3.54)	3.00 <sup>b</sup> (2.16–3.36)
PR jet (m/秒)	–	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
LA/Ao	1.27 (1.13–1.33)	1.43 <sup>a</sup> (1.33–1.68)	1.94 <sup>a,b</sup> (1.81–2.27)	2.17 <sup>a,b</sup> (1.92–2.73)	2.36 <sup>a,b</sup> (1.96–2.78)
LVIDd (cm)	2.20 (1.95–2.65)	2.38 (2.05–2.86)	3.28 <sup>a,b</sup> (2.74–3.87)	3.08 (1.16–3.52)	3.31 <sup>a,b</sup> (3.05–3.79)
LVIDdN	1.39 (1.26–1.50)	1.61 <sup>a</sup> (1.39–1.71)	1.90 <sup>a,b</sup> (1.77–2.24)	2.06 (1.92–2.32)	2.21 <sup>a,b</sup> (1.96–2.33)
NT-proANP (pg/mL)	4648 (1115–2100)	2570 <sup>a</sup> (2064–4444)	4608 <sup>a</sup> (2434–5728)	6302 <sup>a,b</sup> (3678–8226)	4825 <sup>a</sup> (3166–8440)
NT-proBNP (pmol/L)	696 (449–991)	1257 <sup>a</sup> (837–2335)	1921 <sup>a</sup> (1390–3752)	5381 <sup>a,b</sup> (1703–8248)	3030 <sup>a</sup> (1772–5934)
ANP (pg/mL)	50.45 (38.05–91.65)	126.05 <sup>a</sup> (84.25–197.15)	191.65 <sup>a</sup> (78.55–555.30)	312.40 <sup>a</sup> (96.57–675.92)	433.40 <sup>a,b</sup> (161.10–560.20)
cTnI (ng/mL)	0.032 (0.008–0.062)	0.078 <sup>a</sup> (0.030–0.147)	0.066 (0.028–0.190)	0.127 <sup>a</sup> (0.056–0.372)	0.099 (0.036–0.836)

(表 5-2 注釈)

データは中央値 (四分位範囲)で示す. MMVD, 粘液腫様変性性僧帽弁疾患; VHS, 椎骨心臓サイズ; VLAS, 椎骨左房サイズ; MR jet, 僧帽弁逆流血流速; TR jet, 三尖弁逆流血流速, PR jet, 肺動脈弁逆流血流速; LA/Ao, 左房内径大動脈根内径比; LVIDd, 拡張末期左室内径; LVIDdN, 体重で標準化した LVIDd; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; cTnI, 心筋トロポニン I; a,  $P < 0.05$  vs 正常群; b,  $P < 0.05$  vs ステージ B1; c,  $P < 0.05$  vs ステージ B2.

各 CB とその他の変数の相関性

単変量解析の結果を表 5-3 に示す. そして, 単変量解析にて各 CB と有意な相関が認められた変数を用いて実施した多変量解析の結果を表 5-4 に示す. 多変量解析では, 血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度に独立して影響する因子として LA/Ao が, そして血漿 cTnI 濃度に独立して影響する因子として VLAS が選択された (NT-proANP,  $P < 0.01$ ,  $r = 0.538$ ; NT-proBNP,  $P < 0.01$ ,  $r = 0.649$ ; ANP,  $P < 0.01$ ,  $r = 0.689$ ; cTnI,  $P < 0.05$ ,  $r = 0.232$ ).

表 5-3. 単変量解析の結果

	NT-proANP	NT-proBNP	ANP	cTnI
年齢 (歳)	0.258 <sup>a</sup>	0.307 <sup>a</sup>	0.293 <sup>a</sup>	0.409 <sup>a</sup>
体重 (kg)	- 0.308 <sup>a</sup>	- 0.330 <sup>a</sup>	- 0.313 <sup>a</sup>	- 0.178
心拍数 (回/分)	0.097	0.077	0.253 <sup>b</sup>	0.276 <sup>a</sup>
呼吸数 (回/分)	- 0.118	- 0.105	0.069	0.114
心雑音のグレード (6段階)	0.389 <sup>a</sup>	0.211	0.201	0.140
VHS (v)	0.474 <sup>a</sup>	0.420 <sup>a</sup>	0.494 <sup>a</sup>	0.303 <sup>a</sup>
VLAS (v)	0.557 <sup>a</sup>	0.534 <sup>a</sup>	0.550 <sup>a</sup>	0.396 <sup>a</sup>
MR jet (m/秒)	0.494 <sup>a</sup>	0.450 <sup>a</sup>	0.455 <sup>a</sup>	0.312 <sup>a</sup>
TR jet (m/秒)	0.974	0.169	0.117	0.872
PR jet (m/秒)	0.616	0.854	0.808	0.368
LA/Ao	0.666 <sup>a</sup>	0.662 <sup>a</sup>	0.629 <sup>a</sup>	0.413 <sup>a</sup>
LVIDdN	0.324 <sup>a</sup>	0.374 <sup>a</sup>	0.375 <sup>a</sup>	0.127

数値は相関係数を示す. VHS, 椎骨心臓サイズ; VLAS, 椎骨左房サイズ; MR jet, 僧帽弁逆流血流速; TR jet, 三尖弁逆流血流速; PR jet, 肺動脈弁逆流血流速; LA/Ao, 左房内径大動脈根内径比; LVIDd, 拡張末期左室内径; LVIDdN, 体重で標準化した LVIDd; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; cTnI, 心筋トロポニン I; a, P<0.01; b, P<0.05.

表 5-4. 多変量解析の結果

従属変数	独立変数	偏相関係数	P値
NT-proANP	LA/Ao	0.538	< 0.01
NT-proBNP	LA/Ao	0.649	< 0.01
ANP	LA/Ao	0.689	< 0.01
cTnI	VLAS	0.232	< 0.05

LA/Ao, 左房内径大動脈根内径比; VLAS, 椎骨左房サイズ; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; cTnI, 心筋トロポニン I.

## CBによる各イベントの識別能

ROC 曲線解析の結果を図 5-2 および表 5-5, 5-6 に示す.

イベント 1 では, 心拡大群に 35 頭, そして非心拡大群に 34 頭のイヌが組み込まれた. 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は血漿 cTnI 濃度と比較して AUC が有意に大きかった ( $P<0.05$ ). 血漿 cTnI 濃度以外の CB 間で AUC に有意差は認められなかったが, 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度は 80.0%と比較的高値であった (カットオフ値, それぞれ 8497 pg/mL および 1453 pmol/L; 95%信頼区間[CI], いずれも 0.64–0.90).

イベント 2 では, CHF 群に 21 頭, そして非 CHF 群に 48 頭のイヌが組み込まれた. 全ての CB の AUC 間に有意差は認められなかったが, 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度は, それぞれ 85.7 および 81.0%であった (カットオフ値, それぞれ 8684 pg/mL および 1772 pmol/L; 95%CI, それぞれ 0.65–0.95 および 0.60–0.92). また, 陰性的中率は血漿 NT-proANP 濃度では 90.6%, 血漿 NT-proBNP 濃度では 88.6%, そして血漿 ANP 濃度では 84.2%と比較的高値を示した (95%CI, それぞれ 0.75–0.96, 0.74–0.95 および 0.69–0.92).

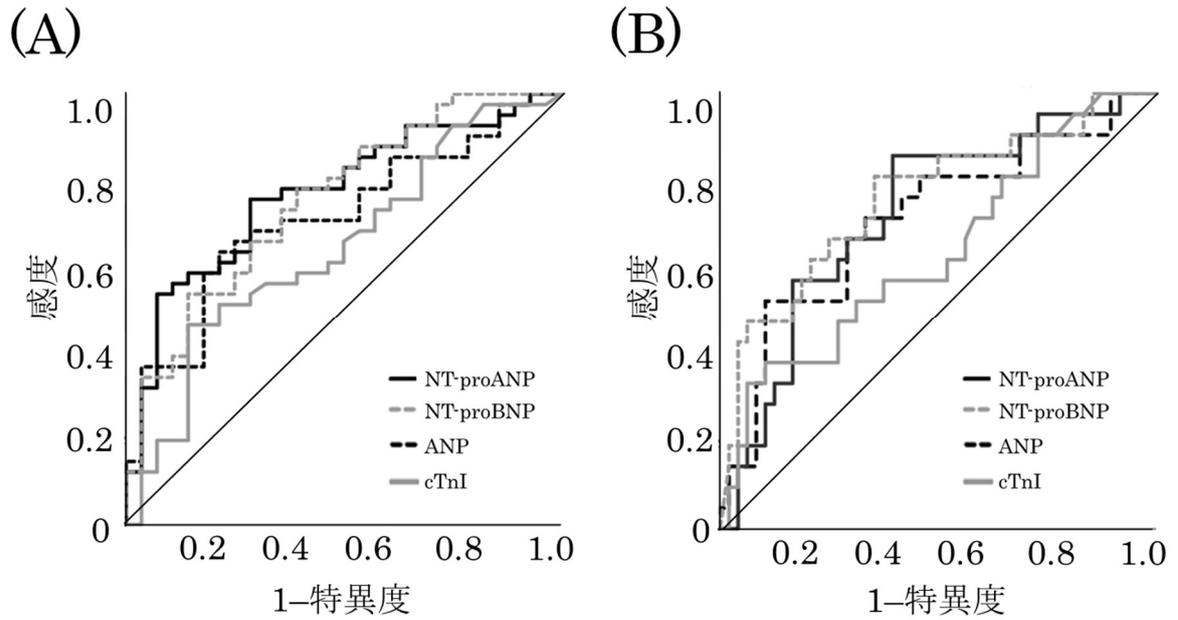


図 5-2. ROC 曲線

A, 心拡大に対する ROC 曲線; B, CHF に対する ROC 曲線. ROC, 受信者動作特性; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; cTnI, 心筋トロポニン I.

表 5-5. イベント 1 の ROC 曲線解析の結果

	NT-proANP	NT-proBNP	ANP	cTnI
カットオフ値	8497 pg/mL	1453 pmol/L	164.20 pg/mL	0.110 ng/mL
AUC	0.72 <sup>†</sup>	0.75 <sup>†</sup>	0.70	0.57
95% CI	0.59–0.84	0.63–0.86	0.58–0.83	0.44–0.71
感度 (%)	80.0	80.0	68.6	48.6
95% CI	0.64–0.90	0.64–0.90	0.52–0.81	0.33–0.64
特異度 (%)	67.6	64.7	70.6	70.6
95% CI	0.50–0.80	0.47–0.78	0.53–0.83	0.53–0.83
陽性的中率 (%)	71.8	70.0	70.6	63.0
95% CI	0.56–0.83	0.54–0.81	0.53–0.83	0.44–0.78
陰性的中率 (%)	76.7	75.9	68.6	57.1
95% CI	0.59–0.88	0.57–0.87	0.52–0.81	0.42–0.70
尤度比	2.46	2.26	2.33	1.65
95% CI	1.48–4.13	1.39–3.67	1.32–4.11	0.88–3.07

イベント 1, 心拡大に対する識別能; ROC, 受信者動作特性; NT-proANP, N 末端プロ心  
房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド;  
cTnI, 心筋トロポニン I; CI, 信頼区間; AUC, 曲線下面積; †, P<0.05 vs cTnI.

表 5-6. イベント 2 の ROC 曲線解析の結果

	NT-proANP	NT-proBNP	ANP	cTnI
カットオフ値	8684 pg/mL	1772 pmol/L	190.40 pg/mL	0.090 ng/mL
AUC	0.72	0.76	0.71	0.63
95% CI	0.59-0.85	0.62-0.89	0.57-0.85	0.48-0.78
感度 (%)	85.7	81.0	71.4	57.1
95% CI	0.65-0.95	0.60-0.92	0.50-0.86	0.36-0.75
特異度 (%)	60.4	64.6	66.7	62.5
95% CI	0.46-0.73	0.50-0.76	0.52-0.78	0.48-0.74
陽性的中率 (%)	48.6	50.0	48.4	40.0
95% CI	0.33-0.64	0.34-0.65	0.32-0.65	0.24-0.57
陰性的中率 (%)	90.6	88.6	84.2	76.9
95% CI	0.75-0.96	0.74-0.95	0.69-0.92	0.61-0.87
尤度比	2.16	2.28	2.14	1.52
95% CI	1.46-3.20	1.48-3.53	1.32-3.47	0.90-2.56

イベント 2, CHF に対する識別能; ROC, 受信者動作特性; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; cTnI, 心筋トロポニン I; CI, 信頼区間; AUC, 曲線下面積.

## 5.4 考察

本章では、血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度は、正常群と比較して全ての ACVIM ステージで有意に高値であった。正常群と比較して全ての ACVIM ステージで有意に高値を示した CB 以外の変数は、LA/Ao のみであり、これは多変量解析にて血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度に独立して関連する変数として選択された。このことから、MMVD のイヌでは LA の拡大に伴い血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度は上昇すると考えられた。また、これらの CB はステージ B1 から上昇していたことから、血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度は心拡大の基準を満たす前段階から LA 拡大に伴い上昇していることが確認できた。血漿 NT-proANP および ANP 濃度は主に心房筋の進展に伴い血中へ放出されるのに対し、血漿 NT-proBNP 濃度は心室筋の伸張に反応して血中へ放出される[56,102]。このことから、本章では血漿 NT-proBNP 濃度は左室拡大の指標である LVIDdN といった変数と相関すると予想していたため、LA/Ao と最も強く相関したことは予想外であった。健康なヒトでは、血中の BNP は 50–60 % が心室から分泌されることが知られているが[68]、CHF のイヌでは BNP は心房からも分泌されることが報告されている[65]。また、左室収縮不全モデルのイヌでは BNP mRNA および心臓組織 BNP は、左室収縮不全の初期段階には心房筋で生成されることが明らかにされている[64]。このことから、本章の血漿 NT-proBNP 濃度および LA/Ao の相関には、MMVD の進行に伴う心房からの BNP 分泌が関与していると思われる。

LA/Ao と同様に心房サイズを反映する VLAS は、血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度と単変量解析では有意に相関したが、多変量解析では独立して関連する変数として選択されなかった。また、VLAS はステージ D と比較してステージ C で高い値を示した。本章では、肺高血圧症を合併していたイヌの割合はステージ C よりもステージ D で多かった（ステージ C; 35.7 %, ステージ D; 71.4 %）。肺高血圧症のイヌでは、後大静脈が拡張する[63]。VLAS は気管分岐部の腹側から左房および後大静脈の交点までの距離を胸椎骨の数で表す[70]。後大静脈が拡張していると、左房および後大静脈の交点が気管分岐部腹側に近づくため、VLAS は実際の左房拡大を過小評価する可能性がある[73]。そのため、本章では LA/Ao とは異なり、VLAS は血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度と強い相関を示さなかったと考えられた。

ROC 曲線解析結果では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、血漿 cTnI 濃度よりも心拡大の優れた識別能を示した。また、この 2 種類の CB では、AUC の CI が一致していたことから、心拡大の識別能は同等と考えられた。また、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度は 80.0 % と比較的高値を示していたことから、無徴候の MMVD のイヌでは血漿 NT-proANP およびまたは NT-proBNP 濃度がカットオフ値以下であれば、ステージ B1 以下である可能性が高いと考えられた。うっ血性心不全の識別能は、すべての CB 間で同等であったが、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度はいずれも 80.0 % 以上で、陰性的中率も 85.0 % 以上と高値を示した。そのため、呼吸困難を示すイヌの血漿 NT-proANP およびまたは NT-proBNP 濃度が本章で設定したカットオフ値以下の場合、呼吸困難の原因として CHF 以外の原因を考慮すべきと思われた。

ANP は心房筋の分泌顆粒に貯蔵されているため、心房筋の伸展に伴い速やかに血中に分泌されるのに対し、BNP は心室に貯蔵するための分泌顆粒が存在しないため、血中への急速分泌は不可能とされている[62,114]。ヒトでは、血漿 BNP 濃度は血漿 ANP 濃度とは異なり、心臓に対する長期間の刺激によって上昇することが報告されている[62]。そのため、無徴候のイヌでの心拡大の識別には血漿 NT-proANP 濃度が、そして CHF の識別には血漿 NT-proBNP 濃度が優れていると思われた。しかし、本章の結果では心拡大および CHF の識別能は血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度でいずれも同等であった。このことから、MMVD のイヌでは心拡大を示す段階は、既に容量およびまたは圧負荷の影響を慢性的に受けており、MMVD のイヌにおける血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の有用性は同等であると考えられた。

血漿 NT-proANP 濃度は、血漿 ANP 濃度と比較して感度および陰性的中率は優れていたものの、AUC に関しては心拡大および CHF のいずれも大きな差は認められなかった。過去のイヌの報告は、半減期の違いから血漿 NT-proANP 濃度の方が血漿 ANP 濃度と比較して CHF の識別能が優れていることを明らかにしている[43]。本章で血漿 NT-proANP および ANP 濃度の AUC がほぼ同じであった理由として、血中の ANP クリアランスの減少が考えられる。CHF のヒトでは、ANP 受容体のダウンレギュレーションに伴い、血中 ANP クリアランスが低下することで、血漿中の NT-proANP と ANP の比率は増加すると考えられている[11,49]。本章では左心拡大をステージ B2 の診断基準に従

って判断した。この診断基準は、左房または左室のいずれかが拡大していれば左心拡大とみなされていた従来の MMVD のステージ分類とは異なり、左房および左室の両者が拡大した場合のみを左心拡大としており、各パラメータの基準値も厳密に設定されている。そのため、本章でステージ B2 に組み込んだイヌでは、過去の報告で心拡大群に組み込まれていたイヌよりも MMVD が進行し、ANP 受容体のダウンレギュレーションが生じていた可能性がある。このことが、過去の研究と異なり、血漿 NT-proANP 濃度と血漿 ANP 濃度の有用性に差を生じさせなかった要因の 1 つと考えられた。

本章では、血漿 cTnI 濃度は他の CB と比較して低い識別能を示した。血漿 cTnI 濃度は、心筋細胞の傷害を反映する[35]。心疾患のイヌで血漿 cTnI 濃度が上昇する理由として、心筋の線維化が挙げられる。心筋の線維化は全ての MMVD のイヌで認められるわけではない[20,31]。そのため、本章では血漿 cTnI 濃度は心拡大および CHF を反映しなかったのかもしれない。しかし、本章では病理組織学的検査を実施していないため、血漿 cTnI 濃度が MMVD のイヌの病態を十分に反映しなかった理由を明らかにすることはできなかった。

本章ではいくつかの制限が存在する。第 1 に、各 CB の AUC、感度および特異度が過去の報告と比較して低かった[89,95]。この原因として、ステージ間で年齢に偏りがあったことが挙げられる。過去のイヌの報告では、血漿 NT-proANP 濃度は加齢に伴い上昇することが明らかにされている[11,30]。対照的に血漿 NT-proBNP 濃度は、MMVD のイヌでは年齢と相関しないことが報告されている[13]。しかし、本章では多変量解析においていずれの CB も年齢は独立変数として選択されなかったものの、単変量解析では血漿 NT-proANP、NT-proBNP および ANP 濃度は年齢と有意に相関していた。このことから、年齢の影響を除外して評価することで血漿 NT-proANP、NT-proBNP および ANP 濃度の識別能が向上する可能性があると考えられた。第 2 に、本章では頸部透視検査および気管支内視鏡検査を実施していないため、気管支虚脱や肺炎などの呼吸器系疾患を完全には除外できなかった。最後に、本章では各 CB に対する薬剤の影響を考慮しなかった。本章ではステージ B2 以上のイヌは全頭でピモベンダン (0.25–0.50 mg/kg, 1 日 2 回) が投与されていたが、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、カルシウムチャネル拮抗薬、ニトログリセリン、シルデナフィルおよび利尿薬の投与に関しては症例毎で異なった。薬剤投与後の各 CB の変化についてはさらなる検討が必要である。

## 5.5 小括

本章では、MMVD のイヌでの血漿 NT-proANP, NT-proBNP, ANP および cTnI 濃度の特徴、そして心拡大および CHF の識別能を調査した。結果として、血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度は LA/Ao と強く相関し、これらの CB および LA/Ao は心拡大の基準を満たす前段階から増加していた。このことから、血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度は、臨床徴候の有無に関係なく、左房拡大に伴い上昇する可能性が考えられた。また、本章では血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、心拡大および CHF を検出する際の感度および陰性的中率は他の CB と比較して高値を示したが、この 2 者の CB 間で識別能に差は認められなかった。そのため、MMVD のイヌでは血漿 NT-proANP および血漿 NT-proBNP 濃度の有用性は同等であることが判明した。

## 第6章

うっ血性心不全徴候を呈さない  
粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌ  
および呼吸器疾患のイヌにおける  
発咳の原因鑑別ツールとしての  
心臓バイオマーカーの有用性

## 6.1 緒言

粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD)は、イヌで最も一般的な心疾患である[12,17]. MMVD のイヌでは、心拡大に伴う気管の背側への挙上によって発咳が認められる[33,38]. 発咳は呼吸器疾患でも生じるため、発咳を示すイヌでは、この原因を心疾患および呼吸器疾患に鑑別することが不可欠である。この鑑別は、問診、身体診察および画像検査の結果から総合的に判断されることが多いが、これらの情報だけでは判断に苦慮する場合がある。

心臓バイオマーカー (CB)検査は、胸部 X 線検査や心エコー図検査と比較して簡便な検査である。イヌで用いられている CB として、血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proANP)および N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)濃度が挙げられる[27,43]. 第 5 章では、これらの CB は MMVD のイヌにおいて心拡大およびうっ血性心不全に対して良好な感度を示すことを見出した[83].

呼吸困難を示すイヌを対象に血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の心疾患および呼吸器疾患の識別能を調査した過去の報告では、血漿 NT-proBNP 濃度は血漿 NT-proANP 濃度よりも識別能が優れていた (血漿 NT-proANP 濃度, 感度 81.7%および特異度 64.7%; 血漿 NT-proBNP 濃度, 感度 85.0%および特異度 82.4%)[13]. しかし、この研究ではうっ血性心不全のイヌも含められていたため、臨床徴候には発咳だけでなく、運動不耐性または生活の質に影響を与えるほどの頻呼吸および努力呼吸も含まれていた。

発咳は、うっ血性心不全徴候を示さないイヌ、つまりアメリカ獣医内科学会 (ACVIM)ステージ B2 以下のイヌでも認められる[55]. MMVD に罹患した ACVIM ステージ B2 以下のイヌでは、明らかな臨床徴候として発咳しか認められないことしばしばあり、呼吸器疾患との鑑別がより困難となる。また、MMVD が好発するトイ・プードルやチワワといった犬種では、気管支虚脱といった呼吸器疾患也多発する[66]. 血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、うっ血性心不全徴候を示さない MMVD のイヌでも上昇することが既に報告されている[43,87]. これらの CB が呼吸器疾患では上昇せず、ACVIM ステージ B2 以下の MMVD のイヌで上昇する場合、発咳が認められるにも関わらず、問診、身体診察および画像検査だけでは、呼吸器疾患との原因鑑別が困難な MMVD のイヌにおいて、非常に有用となる可能性がある。

したがって、本章の目的は、うっ血性心不全徴候を呈さない MMVD のイヌおよび呼吸

器疾患のイヌにおいて、発咳の原因鑑別に血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が有用か否かを比較調査することとした。

## 6.2 材料および方法

### 供試動物

2018年6月から2021年2月の間に日本獣医生命科学大学附属動物医療センター循環器科または呼吸器科を受診し、発咳が認められたイヌを組み込んだ。本章では、診断のために採血が必要であったイヌから血液検体を採取した。全てのイヌの家族からインフォームド・コンセントを得た上で検体収集を実施した。

全てのイヌで問診、身体診察および胸部 X 線検査を実施し、必要に応じて心エコー図検査、心電図検査、胸部透視検査および気管支内視鏡検査を実施した。発咳の原因が MMVD と判断されたイヌは MMVD 群に、そして呼吸器疾患によるものと判断されたイヌは呼吸器疾患 (RD)群に組み込んだ。咳の原因がいずれか、あるいは両者であるという最終的な判断は、循環器科および呼吸器科の担当獣医師によって行われた。臨床的評価は全て静かな診察室で実施し、気管支内視鏡検査以外の検査は非麻酔下で実施した。

### MMVD 群の組み込み基準

MMVD 群のイヌでは、全頭で身体診察および胸部 X 線検査に加え、心エコー図検査を実施した。MMVD のステージは ACVIM のガイドラインに従って分類した[55]。本章では、うっ血性心不全徴候が認められない MMVD のイヌ (つまり ACVIM ステージ B1 および B2)を組み込んだ。組み込み基準は以下の通りである。

- 1) 身体診察にて心雑音が聴取され、かつ発咳誘発試験 (喉頭圧迫試験)が陰性
- 2) 心エコー図検査にて僧帽弁の粘液腫様変性による肥厚および僧帽弁逆流を認める
- 3) 左心拡大の条件[56] (椎骨心臓サイズ[VHS]>10.5 v, 左房内径大動脈根内径比 [LA/Ao]≥1.6 および体重で標準化した拡張末期左室内径[LVIDdN]≥1.7) を 1 つ以上満たす
- 4) 胸部 X 線写真側面像にて心拡大に伴う気管挙上が認められる

本章では基準 1), 2)および 3)は必須とし、4)に関しては該当しなくとも、MMVD に対

する治療開始後に発咳が良化した症例は研究に組み込んだ。基準 3)については、左心拡大の条件を 1 つ以上満たしていればステージ B1 に、そして全て満たしている場合はステージ B2 に分類した。なお、本来 MMVD のイヌではステージ B2 以上が治療対象とされているが、本章ではステージ B1 のイヌでも発咳が認められる場合はピモベンダンまたはアンジオテンシン変換酵素阻害薬による治療を開始した。そして、MMVD に対する治療を開始したステージ B1 のイヌのうち、治療開始後に発咳が良化しなかった症例は本研究から除外した。

### RD 群の組み込み基準

RD 群のイヌでは、全頭で身体診察および胸部 X 線検査に加え、気管およびまたは気管支虚脱が疑われた症例は頸部透視検査が、そして気管支炎または肺炎が疑われた症例では気管支肺胞洗浄検査を実施した。これらの結果に基づき、本章では RD 群に気管およびまたは気管支疾患、そして肺疾患のイヌを組み込んだ。組み込み基準は以下の通りである。

- 1) 身体診察にて心雑音が聴取されない
- 2) 呼吸器科にて気管およびまたは気管支疾患、あるいは肺疾患と診断された
- 3) 呼吸器疾患に対する治療開始後に発咳が良化した場合

本章では基準 1)および 2)は必須とし、基準 3)に関しては胸部 X 検査のみで呼吸器疾患と診断されたイヌを対象とした。

### 除外基準

本章では、発咳の原因として MMVD および呼吸器疾患の両者が疑われたイヌ、そして受診時に既に MMVD および呼吸器疾患の両者に対する治療が実施されていたイヌは除外した。また、第 3 章の結果を踏まえ、慢性腎臓病のイヌ、あるいは呼吸器と関連しない腫瘍性疾患を併発しているイヌも除外した。

## 評価項目

評価項目は、年齢、体重、心拍数、呼吸数、VHS、椎骨左房サイズ (VLAS)、気管挙上の有無、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度とした。

## CB の測定

血液をイヌの頸静脈から採取し、EDTA-2K (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、福島)に 2 mL 分注し、4 °C で 1187 g、5 分間遠心分離した。得られた血漿は-80 °C で保管し、外部検査機関 (NT-proANP、共立製薬株式会社、東京; 血漿 NT-proBNP 濃度; IDEXX ラボラトリーズ株式会社、東京)に測定を委託した。血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は第 1 章および第 3 章と同様の方法で測定した。

## 胸部 X 線検査

イヌを右下横臥位または腹臥位に保定して、右側面および背腹面の胸部 X 線画像を得た。VHS および VLAS は、過去の報告に従って測定した[18,70]。本章では、過去の報告に基づき  $VHS > 10.5$  v で心拡大、そして  $VLAS \geq 2.3$  v で左房拡大と判断した[55,70]。ただし、VHS の基準値には犬種差があることが報告されているため、犬種毎での基準値が報告されている場合はそれに従った[9,50,59]。

発咳誘発試験 (喉頭圧迫試験)が陽性のイヌでは、吸気時だけでなく呼気時にも胸部 X 線撮影を実施した。

## 統計学的解析

統計解析は、市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24 (日本 IBM 株式会社、日本)を用いて実施した。データの正規性は Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した。MMVD 群および RD 群の各 CB と変数の比較は、Wilcoxon の符号順位検定を用いて実施した。受信者動作特性 (ROC) 曲線解析を用いて、MMVD および呼吸器疾患の鑑別能 (AUC, 感度および特異度を用いて評価)を求めた。カットオフ値は、作製された ROC 曲線で左上に最も近い点から求めた。また、CB の AUC の比較は DeLong 検定を用いた。P 値  $< 0.05$  を統計的に有意とした。

## 6.3 結果

### 組み込んだ症例の特徴

本章では計 57 頭のイヌを組み込んだ (表 6-1). MMVD 群 (31 頭)では, ステージ B1 のイヌが 5 頭, そして B2 のイヌが 26 頭組み込まれた. ステージ B2 のイヌのうち, 肺高血圧症を合併したイヌは 10 頭であった. RD 群 (26 頭)では, 気管支疾患のイヌが 22 頭 (気管・気管支虚脱, 16 頭; 気管支炎, 6 頭[うち 2 頭は気管・気管支虚脱を, そして別の 2 頭は気管支軟化症を合併), そして肺疾患のイヌが 4 頭 (誤嚥性肺炎, 2 頭; 肺線維症, 1 頭; 間質性肺炎, 1 頭)組み込まれた. 犬種の内訳は表 6-2 に示す.

血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は, いずれも MMVD 群および RD 群間で有意差を示した (それぞれ  $P<0.01$ ). CB 以外の変数では, VHS および VLAS が MMVD 群と RD 群との間で有意差を示した (それぞれ  $P<0.01$ ).

MMVD 群のイヌでは, 全頭で VHS が参考範囲を逸脱していた. RD 群のイヌでも VHS が 10.5 v を上回るイヌが 3 頭存在したが, いずれも犬種毎で設定された参考範囲の範囲内であった. MMVD 群のイヌでは全頭で VLAS が参考範囲 ( $\geq 2.3$  v)を上回り, 左房拡大を示した. しかし, 胸部 X 線検査にて左房拡大に伴う気管挙上 (図 6-1)が認められた MMVD のイヌは, 18 頭であった. RD 群で VLAS $\geq 2.3$  v のイヌは 2 頭存在したが, いずれも心雑音が聴取されなかったこと, そして VHS は正常範囲内であったことから (それぞれ 9.2 および 10.2 v), 左房は拡大してないと判断した.

表 6-1. 本章で組み込んだイヌの特徴

	MMVD群	RD群
症例数 (頭)	31	26
性別 (頭)		
雄	4	7
去勢雄	12	10
雌	1	1
避妊雌	14	8
体重 (kg)	4.4 (3.3-6.1)	5.8 (3.8-7.6)
年齢 (歳)	10.0 (6.6-14.0)	9.8 (8.5-12.1)
心拍数 (回/分)	138 (125-150)	121 (108-141)
呼吸数 (回/分)	56 (36-100)	51 (32-99)
VHS (v)	11.1 (11.0-12.5)	10.1 <sup>a</sup> (9.8-10.7)
VLAS (v)	2.7 (2.4-3.0)	2.0 <sup>a</sup> (1.8-2.3)
NT-proANP (pg/mL)	14027 (7295-22929)	4598 <sup>a</sup> (3555-5644)
NT-proBNP (pmol/L)	3316 (1506-5878)	765 <sup>a</sup> (526-997)

データは中央値 (四分位範囲)で示す. MMVD, 粘液腫様変性性僧帽弁疾患; RD, 呼吸器疾患; VHS, 椎骨心臓サイズ; VLAS, 椎骨左房サイズ; NT-proANP, N末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド; a, P<0.01 vs MMVD 群.

表 6-2. 犬種の内訳

	MMVD群	RD群
キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル	8	0
ダックスフンド	1	5
チワワ	8	3
トイ・プードル	6	3
パピヨン	2	0
ポメラニアン	0	3
その他	6	12

値は全て頭数. MMVD, 粘液腫様変性性僧帽弁疾患; RD, 呼吸器疾患.

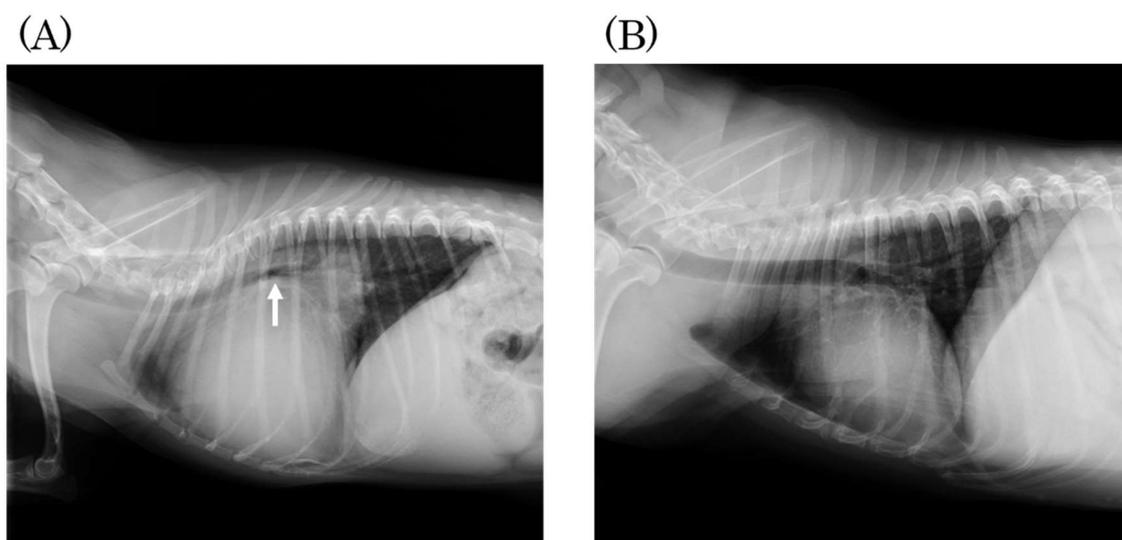


図 6-1. 左房拡大に伴う気管挙上が認められるイヌ (A)および認められないイヌ(B)の胸部 X線右側面. この2頭のイヌはいずれも MMVD 群でステージ B2 であった. MMVD, 粘液腫様変性性僧帽弁疾患; 矢印, 気管挙上部位.

## 発咳に対する CB の鑑別能

ROC 曲線解析の結果を図 6-2 および表 6-3 に示す。

血漿 NT-proANP と NT-proBNP 濃度との間で AUC に有意差は認められなかった ( $P=0.85$ )。血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度は 93.9% および 97.0%，そして特異度はいずれも 82.1% であった (カットオフ値, それぞれ 6895 pg/mL および 1153 pmol/L; 95% 信頼区間 [CI], それぞれ 0.64–0.90 および 0.64–0.90)。

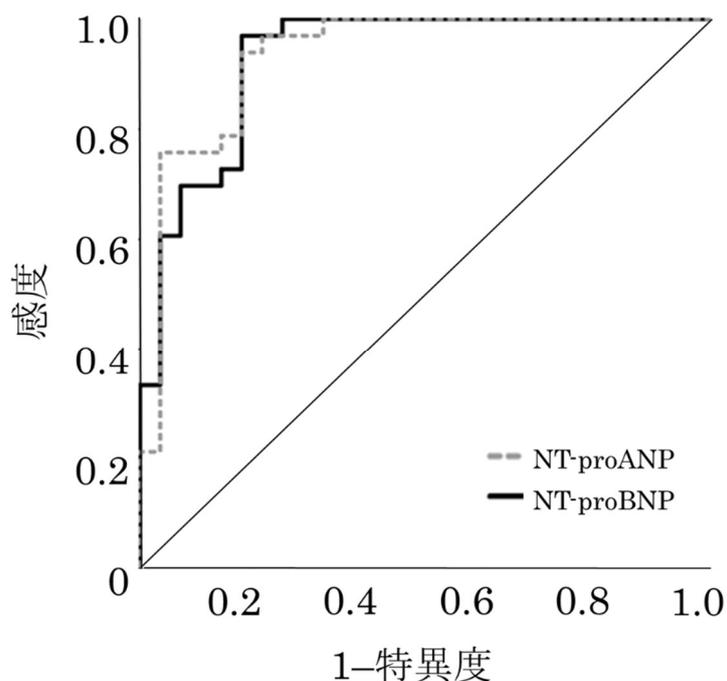


図 6-2. ROC 曲線

ROC, 受信者動作特性; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド。

表 6-3. ROC 曲線解析の結果

	NT-proANP	NT-proBNP
カットオフ値	6895 pg/mL	1153 pmol/L
AUC	0.93	0.92
95% CI	0.86–0.99	0.86–0.99
感度 (%)	93.9	97.0
95% CI	0.60–0.96	0.79–1.00
特異度 (%)	82.1	82.1
95% CI	0.64–0.92	0.64–0.92
陽性的中率 (%)	70.6	73.7
95% CI	0.47–0.87	0.51–0.88
陰性的中率 (%)	92.0	100
95% CI	0.75–0.98	0.86–1.0
尤度比	4.79	5.59
95% CI	2.11–10.93	2.53–12.39

ROC, 受信者動作特性; NT-proANP, N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド; NT-proBNP, N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド; CI, 信頼区間; AUC, 曲線下面積.

## 6.4 考察

本章では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、いずれも MMVD 群と RD 群との間で有意差を認め、ROC 曲線解析でも良好な識別能を示した。特に、本章では MMVD 群と RD 群の感度は、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の両方で 90% を超えた。このことから、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、うつ血性心不全徴候を呈さない MMVD と呼吸器疾患のイヌにおける発咳の原因鑑別に有用であると考えられる。ACVIM の MMVD に関するガイドラインでは、治療開始が推奨されているのはステージ B2 以降の症例である[55]。本章では、ステージ B1 のうち 5 例は MMVD に対する治療の実施後に発咳が消失した。このことから、生活の質に影響を及ぼすレベルの発咳を示す MMVD のイヌが、血漿 NT-proANP または NT-proBNP 濃度が高値を示した場合は、ステージ B1 だとしても治療を開始すべきかもしれない。

過去に血中 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の心疾患と呼吸器疾患の鑑別能を調査した研究では、感度がそれぞれ 81.7% および 85.0%，そして特異度がそれぞれ 64.7% および 82.4% であった[13]。本章では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度はそれぞれ 93.9% および 97.0%，そして特異度はいずれも 82.1% であった。本章での各 CB の感度が過去の報告と比較して高値であった理由として、心疾患を MMVD に限定したこと、そして臨床徴候を発咳に限定したことが挙げられる。MMVD のイヌでは、左心房拡大による気管およびまたは左主幹気管支の背側への圧迫によって発咳が生じる[44]。第 5 章では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が左房拡大に伴い上昇することを明らかにした[83]。本章では MMVD 群の全頭で VLAS は参考範囲を逸脱し、左房拡大を示していた。また、VLAS は RD 群と比較して MMVD 群で有意に高値を示した。以上のことから、発咳を示すイヌでは、血漿 NT-proANP または NT-proBNP 濃度が高値かつ VLAS $\geq$ 2.3 v の場合、MMVD の左房拡大に伴う気管圧迫による発咳の可能性が高いと思われる。

発咳を呈する MMVD のイヌでは、胸部 X 線検査所見として心拡大に伴う気管挙上が認められる。胸部 X 線検査は、心臓だけでなく、気管および肺野の評価も可能であるため、発咳の原因鑑別に不可欠な検査である。しかし、発咳を示すイヌでの胸部 X 線検査所見を調査した過去の報告では、MMVD に罹患したイヌの 46% では気管挙上といった所見を認めなかった[38]。本章でも MMVD 群のイヌのうち 18 頭 (41%) のイヌでは、胸

胸部 X 線検査にて明らかな気管挙上所見が認められなかった。また、気管虚脱は 59–92 % のイヌで胸部 X 線検査により診断可能とされているが[38,51,66]、慢性気管支炎の診断に関しては胸部 X 線検査の精度は限られている[71]。このことから、胸部 X 線検査だけでは MMVD と呼吸器疾患の鑑別は困難なことがあり、心エコー図検査や透視検査といった追加検査が必要な場合がある。そのため、血漿 NT-proANP または NT-proBNP 濃度の測定は、胸部 X 線検査だけでは発咳の鑑別が困難で、追加検査が必要な場合に有用となると思われる。

過去のイヌの報告では、肺高血圧症でも血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は上昇することが報告されている[56]。RD 群では、26 頭中 4 頭が本章で設定した血漿 NT-proANP または NT-proBNP 濃度のいずれかのカットオフ値を上回り、26 頭中 3 頭では血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度のカットオフ値をどちらも上回っていた。この 3 頭のうち 1 頭は間質性肺炎であったため、身体診察および胸部 X 線検査では確認できない程度の肺高血圧症を合併しており、その結果 CB が上昇した可能性が考えられた[56,97]。しかし、他の 2 頭のイヌに関しては、いずれも気管虚脱であり、性別や年齢においても他の RD 群のイヌと比較して特異的な特徴が認められなかった。そのため、この 2 頭のイヌで血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が上昇した理由を明らかにすることはできなかった。

本章にはいくつかの制限が存在する。第 1 に、本章では MMVD 群のイヌには頸部透視検査といった呼吸器疾患の精査を実施していなかった。過去の MMVD に罹患したイヌの報告は、左房拡大の有無で症例を分け、気管虚脱の発生頻度、そして気管の虚脱または炎症部位の分布を比較したが、有意差がなかったことを明らかにしている[105,111]。このことから、MMVD 群の中には身体診察や胸部 X 線検査では確認できなかった呼吸器疾患を併発していた可能性も考えられた。第 2 に、本章では RD 群に組み込まれたイヌでの酸素飽和度に関する情報が欠如していた。ラットでは、低酸素状態で血漿 ANP および BNP 濃度が上昇することが報告されている[116]。そのため、本章の RD 群で血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が高値であったイヌは、酸素飽和度が低下し、低酸素状態にあった可能性も考えられた。血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度に対する血中酸素濃度の影響に関しては、さらなる研究が必要である。

## 6.5 小括

本章では、うつ血性心不全徴候を呈さない MMVD のイヌおよび呼吸器疾患のイヌにおいて、発咳の鑑別に血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が有用かどうかを調査した。その結果、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の両者は MMVD のイヌと呼吸器疾患のイヌにおける発咳の原因鑑別に優れ、その鑑別能はこの 2 者で同等であった。また、本章では MMVD 群の全頭で VLAS が高値を示していたこと、そして第 5 章で確認したように、MMVD のイヌでは血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が左房拡大に伴い上昇することを踏まえると、これらの CB に加え、VLAS を測定することが発咳の原因としての MMVD と呼吸器疾患の鑑別をより正確に行うことが可能になると思われた。

# 第7章

## 総括

本研究では、心臓バイオマーカー (CB)の1種である血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proANP) 濃度に影響を与える要因を調査し、イヌの心疾患のうち最も発生率が高い粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD)での診断的有用性をはじめとする血漿 NT-proANP 濃度の臨床的意義を調査した。

第1章では、イヌでの MMVD の疫学および病態といった概要を述べ[12,16,18,55], 続いて現在獣医学領域で用いられている代表的な CB (血漿 ANP および N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド[NT-proBNP]濃度)の有用性および違いを生合成および分泌機序も含めて要約した[27,69,97,102,107]. そして、血漿 NT-proANP 濃度は血漿 ANP 濃度と比較して半減期が長く、血漿 NT-proBNP 濃度と同じく血中での安定性が優れていることを述べた[3,25,102,120,125]. その上で、イヌでは血漿 NT-proANP 濃度に関する研究は血漿 NT-proBNP 濃度と比較して明らかに不足していること、そしてこのために CB としても血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の有用性が十分に比較・検討されていないことを指摘した。

## 第2章 イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する食事の影響および日内変動に関する検討

ラットでは、血漿 NT-proANP 濃度は食事の影響を受け、そして日内変動が認められることが明らかにされているが[85], イヌでは不明である。これらを評価することは、イヌにおいて CB として血漿 NT-proANP 濃度を測定する上で適正な採血タイミングを設定し、病態をより正確に反映させるために重要であると考えられた。また、イヌでは自律神経機能の指標である心拍数および心拍変動 (HRV)に日内変動が存在し、ヒトではこれらが血漿 NT-proANP 濃度と関連することが報告されている[72,112,119]. よって、本章では臨床的に健康なイヌを用いて血漿 NT-proANP 濃度に対する食事の影響および日内変動を評価し、血漿 NT-proANP 濃度に日内変動が存在する場合、この変動に自律神経機能が関与しているか否かも併せて調査した。本章では、臨床的に健康な 5 頭のイヌを用いて検討し、心拍数および HRV の測定にはホルター心電図検査を用いた。

その結果、血漿 NT-proANP 濃度は、食事の影響を受けなかった。また、この濃度の統計学的な有意差はなかったが、19:30 に一過性に上昇し、夜間 (22:30 から翌日 7:30)に減

少傾向を示した。血漿 NT-proANP 濃度は全 RR 間隔の標準偏差 (RMSSD) と逆相関を示したが、その相関性にはばらつきが認められた。心拍数および HRV の結果より、19:30 には交感神経活性が亢進し、22:30 から翌日 4:30 の間は迷走神経活性が亢進している可能性が考えられた。しかし、翌日 4:30 から 7:30 では、血漿 NT-proANP 濃度の変動とは異なり、交感神経活性の亢進を示したイヌと迷走神経活性の亢進を示したイヌの両者が認められた。

以上のことから、血漿 NT-proANP 濃度の測定のために採血する際には、食事の影響は考慮する必要はないと判断された。しかし、時刻毎で統計学的有意差は認められなかったものの、日内で変動する傾向を示したことから、日内変動に関しては考慮する必要があると思われた。特に、交感神経活性の亢進時に血漿 NT-proANP 濃度は上昇する可能性が考えられたことから、採血時にイヌが興奮または緊張状態の場合は、血漿 NT-proANP 濃度の解釈に注意が必要と考えられた。

### 第 3 章 イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチドおよび N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する水和状態の影響に関する検討

イヌでは、血漿 ANP 濃度は脱水時に低下傾向を示すことが報告されている[121]。NT-proANP は ANP と等モル量で血中へ放出されるため、血漿 NT-proANP 濃度も脱水時に低下する可能性がある[102]。また、ヒトでは脱水時に心室容積が減少し、心室の伸展性が低下することによって血漿 NT-proBNP 濃度が低下することが報告されている[26,109]。しかし、イヌではこのような報告はない。よって本章では、イヌでの血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度に対する脱水の影響を評価した。本章では臨床的に健康なイヌ 5 頭にフロセミドを 1-2 時間おきに 2-4 mg/kg の用量で静脈内投与し、脱水モデルを作成した[19]。5 %以上の体重減少、かつ身体診察にて脱水所見が認められた時点を脱水モデル完成とした。脱水モデル作製前 (ベースライン[BL])、脱水モデル完成時、そして脱水が改善したと判断した時点の計 3 ポイントで血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度を比較した。

その結果、血漿 NT-proANP 濃度は BL と比較して脱水モデル完成時に有意に減少したが、血漿 NT-proBNP 濃度は減少傾向を示したものの、脱水前後で有意差を示さなか

った。血漿 NT-proANP 濃度と体重および血漿 NT-proBNP 濃度が、そして血漿 NT-proBNP 濃度と電解質および心エコー図検査パラメータ（拡張期左室内径 [LVIDd]および体重で標準化した LVIDd [LVIDdN])が有意に相関した。特に、血漿 NT-proANP 濃度は、減少した体重と正相関することが明らかとなった。

以上の結果から、脱水状態のイヌでは血漿 NT-proANP 濃度は、心疾患の重症度を過小評価する可能性が考えられた。血漿 NT-proBNP 濃度は脱水の前後で統計学的有意差は認められなかったが、血漿 NT-proANP 濃度、血漿 Na 濃度および左室内径パラメータと有意に相関したことから、より重度な脱水時には心室内腔の縮小に伴い有意に減少する可能性が考えられた。また、血漿 NT-proANP 濃度は脱水時の体重と相関したことから、今後体液量の指標として応用できる可能性が考えられた。しかし、本章では血漿 Na 濃度の結果より、脱水が改善したと判断した時点でも低張性脱水は依然として生じていた可能性が考えられる。そのため、血漿 NT-proANP 濃度が体液量の指標としての活用できるか否かは、今後さらなる研究が必要であると思われた。

#### 第4章 イヌの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する糸球体濾過量の影響

ヒトでは、血漿中に放出された NT-proANP の 17 %が腎臓から排泄される[104]。イヌでもその一部が腎臓から排泄されるのであれば、糸球体濾過量 (GFR)の低下は血漿 NT-proANP 濃度の上昇に関与すると考えられる。イヌで血漿 NT-proANP 濃度が GFR の影響を受ける場合、慢性腎臓病を併発した心疾患の症例では、血漿 NT-proANP 濃度の解釈に注意する必要があると思われる。よって、本章では、イヌでの血漿 NT-proANP 濃度および GFR の関連を調査した。本章では、回顧的横断研究を採用し、本学付属動物医療センター腎臓科または外部の動物病院で血漿イオヘキソール・クリアランス (PCio) 試験によって GFR を測定したイヌを組み込んだ。PCio が 1.8 mL/min/kg を超えていたイヌを正常群、0.9–1.8 mL/min/kg であったイヌを軽度 GFR 低下群、そして 0.9 mL/min/kg 未満であったイヌを重度 GFR 低下群に分類した[75]。

結果として、本章では 59 頭のイヌが組み込まれた（正常群, 19 頭; 軽度 GFR 低下群, 26 頭; 重度 GFR 低下群, 14 頭）。血漿 NT-proANP 濃度は正常群および軽度 GFR 低下

群と比較して重度 GFR 低下群で有意に上昇した。重度 GFR 低下を検出するための血漿 NT-proANP 濃度のカットオフ値は 12683 pg/mL であった。

以上の結果から、血漿 NT-proANP 濃度は GFR の影響を受けるが、この影響は GFR が重度に低下した場合のみであり、軽度な GFR の低下では血漿 NT-proANP 濃度はほとんど影響されないと考えられた。本章で設定されたカットオフ値である 12683 pg/mL は、第 5 章で設定したうっ血性心不全を示すイヌのカットオフ値である 8684 pg/mL を大きく上回っていた。そのため、心疾患のイヌで血漿 NT-proANP 濃度が 12683 pg/mL を超える場合は、GFR 低下の影響を受けていることも考慮すべきと思われる。

## 第 5 章 粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌでの血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度および 3 種類の心臓バイオマーカーの病態に対する識別能の比較

MMVD のイヌでは、血漿 NT-proANP 濃度と現在イヌで用いられている 3 種類の CB (血漿 NT-proBNP, ANP および心筋トロポニン I [cTnI] 濃度) における診断的有用性を比較した研究は存在しない。MMVD のイヌで血漿 NT-proANP 濃度と分泌機構の異なる他の CB の特徴、そして心拡大およびうっ血性心不全 (CHF) の識別能を比較することは、MMVD のステージに適した CB を選択する上で重要であると考えられる。よって、本章では、MMVD のイヌでの血漿 NT-proANP, NT-proBNP, ANP および cTnI 濃度の特徴、そして心拡大および CHF の識別能を評価することを目的とした。本章では、多施設共同前向き研究を採用し、本学付属動物医療センター循環器科または外部の 7 施設からデータを収集した。組み込んだイヌは正常群 (正常心およびアメリカ獣医内科学学会 [ACVIM] ステージ A) または MMVD 群 (ACVIM ステージ B1, B2, C および D) に分類した。

結果として、本章では計 105 頭のイヌが組み込まれた (正常群, 36 頭; MMVD 群, 69 頭; ステージ B1, 34 頭; B2, 14 頭; C, 14 頭; D, 7 頭)。血漿 cTnI 濃度以外の CB は、正常群に対してステージ B1, B2, C および D で有意に上昇した。多変量解析では、左房内径大動脈根内径比 (LA/Ao) が血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度に独立して関連する変数として選択された。受信者動作特性 (ROC) 曲線解析では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、心拡大および CHF に対する感度および陰性的中

率は他の CB と比較して高値を示したが、この 2 つの CB 間では識別能に差は認められなかった。

以上の所見から、血漿 NT-proANP, NT-proBNP および ANP 濃度は、臨床徴候の有無に関係なく、左房拡大に伴い上昇すると考えられた。ROC 曲線解析の結果も踏まえると、臨床徴候がない、あるいは画像検査にて明らかな心拡大所見が認められない MMVD のイヌにおいて、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は MMVD の早期発見の一助となると考えられた。また、本章では血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度はいずれも左房拡大と関連し、心拡大および CHF に対する識別能は同等であることを確認した。

## 第 6 章 うっ血性心不全徴候を呈さない粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌおよび呼吸器疾患のイヌにおける発咳の原因鑑別ツールとしての心臓バイオマーカーの有用性の比較評価

第 5 章では、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は、MMVD のイヌでの心拡大に対する識別能は同等であることが明らかとなった。しかし、ANP は BNP と比較して心房筋の進展時に速やかに分泌されることがヒトで報告されている[41,114]。そのため、血漿 NT-proANP 濃度は ACVIM ステージ B2 に達する前から上昇すると考えられた。MMVD のイヌでは左房拡大に伴う気管およびまたは左主幹気管支の背側への圧迫によって発咳が生じ、この発咳は ACVIM ステージ B2 に達する前から認められることがある[55]。よって、本章ではうっ血性心不全徴候を呈さない MMVD のイヌおよび呼吸器疾患のイヌにおいて、発咳の原因鑑別に血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度が有用かどうかを調査した。本章では、本学付属動物医療センター循環器科または呼吸器科を受診し、かつ受診時に発咳が認められたイヌを組み込んだ。発咳が MMVD によるものと判断されたイヌは MMVD 群に、そして呼吸器疾患によるものと判断されたイヌは呼吸器疾患群 (RD 群) に組み込んだ。なお、本章では MMVD および呼吸器疾患の両者を併発した症例は除外した。

結果として、本章では計 57 頭のイヌが組み込まれた (MMVD 群, 31 頭; RD 群, 26 頭)。血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度はいずれも RD 群と比較して MMVD 群で有

意に上昇し、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度の感度は 93.9 % および 97.0 %, そして特異度はいずれも 82.1 % であった。

以上の所見から、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度は MMVD のイヌおよび呼吸器疾患のイヌにおける発咳の原因鑑別に優れ、その鑑別能はこの 2 種類の CB で同等であった。イヌでは発咳の原因鑑別が胸部 X 線検査だけでは困難な場合がある。このような症例では、血漿 NT-proANP 濃度は血漿 NT-proBNP 濃度と同様に有用であることが判った。

#### 本研究の結論および今後の展望

本研究では、血漿 NT-proANP 濃度が夜間に減少傾向を示し、交感神経活性の亢進と共に上昇する可能性があること、そして脱水および糸球体糸球体濾過量の影響を受けることを明らかにした。交感神経活性の亢進時に血漿 NT-proANP 濃度が上昇することは、血漿 NT-proANP 濃度測定のための採血時にイヌが興奮または緊張状態にあった場合、結果の解釈には注意が必要となることから、臨床的に重要と思われた。また、血漿 NT-proANP 濃度は脱水時に減少すること、そして GFR が重度に低下するまで GFR の影響を受けないことから、血漿 NT-proANP 濃度は、イヌでの体液量の指標となる可能性があり、将来的には血液透析後の体液量の指標として活用できるのかもしれない。

MMVD に対する血漿 NT-proANP 濃度の臨床的有用性は、現在臨床現場で最も用いられている血漿 NT-proBNP 濃度のそれと同等だと考えられた。また、これらの CB は、うっ血性心不全徴候を呈さない MMVD のイヌの発咳原因と呼吸器疾患のイヌの発咳原因の鑑別が可能であった。そのため、MMVD のイヌで CB 検査を実施する際、血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度のどちらを選択するかは、これら CB の影響因子を考慮すべきと考えられた。本研究の結果より、イヌが興奮または緊張状態にある場合、あるいは脱水している場合には血漿 NT-proANP 濃度ではなく血漿 NT-proBNP 濃度を CB として選択すべきかもしれない。しかし、イヌでは血漿 NT-proBNP 濃度は GFR と強く相関することが報告されている[75]。本章では、GFR の影響を血漿 NT-proANP および NT-proBNP 濃度で比較しなかったが、本研究の結果を踏まえると、軽度に GFR が減少しているイヌでは血漿 NT-proANP 濃度の方が MMVD の病態を反映する可能性が

考えられた。

今後の展望として、より最適な血漿 NT-proANP 濃度の採血タイミングを設定するため、頻脈と血漿 NT-proANP 濃度の関連性を調査する必要があると考えられる。また、第 3 章で十分に検討することができなかった水和状態改善後の血漿 NT-proANP 濃度の変化を再調査することで、より血漿 NT-proANP 濃度が体液量の指標として有用か否か確認できると思われる。そして、第 4 章で血漿 NT-proANP 濃度が高値を示したメラノーマなどの腫瘍性疾患の症例で血漿 NT-proANP 濃度を測定することは、血漿 NT-proANP 濃度の心拡大または CHF に対する過大評価を防ぐ上で重要であると考えられる。

## 参考文献

1. 1996. Task Force of the European Society of Cardiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 93: 1043-1065.
2. Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L. and Syme, H. M. 2018. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 32: 1803-1822.
3. Ackerman, B. H., Wyeth, R. P., Vesely, D. L., Ngo, W. L., Bissett, J. K., Winters, C. J. and Sallman, A. L. 1992. Pharmacokinetic characterization of the postdistribution phase of prohormone atrial natriuretic peptides amino acids 1-98, 31-67, and atrial natriuretic factor during and after rapid right ventricular pacing in dogs. *J Clin Pharmacol* 32: 415-421.
4. Ackermann, U., Khanna, J. and Irizawa, T. G. 1988. Atrial natriuretic factor alters autonomic interactions in the control of heart rate in conscious rats. *Can J Physiol Pharmacol* 66: 930-936.
5. Adem, A., Al Haj, M., Benedict, S., Yasin, J., Nagelkerke, N., Nyberg, F., Yandle, T. G., Frampton, C. M., Lewis, L. K., Nicholls, M. G. and Kazzam, E. 2013. ANP and BNP responses to dehydration in the one-humped camel and effects of blocking the renin-angiotensin system. *PLoS One* 8: e57806.
6. Adnot, S., Andrivet, P., Chabrier, P. E., Defouilloy, C., Viossat, I., Braquet, P., Atlan, G. and Brun-Buisson, C. 1990. Plasma levels of atrial natriuretic factor, renin activity, and aldosterone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Response to O<sub>2</sub> removal and to hyperoxia. *Am Rev Respir Dis* 141: 1178-1184.
7. Arlt, J., Jahn, H., Kellner, M., Ströhle, A., Yassouridis, A. and Wiedemann, K. 2003. Modulation of sympathetic activity by corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide. *Neuropeptides* 37: 362-368.

8. Artunc, F., Mueller, C., Breidhardt, T., Twerenbold, R., Rettig, I., Usta, E., Häring, H. U. and Friedrich, B. 2012. Comparison of the diagnostic performance of three natriuretic peptides in hemodialysis patients: which is the appropriate biomarker? *Kidney Blood Press Res* 36: 172-181.
9. Birks, R., Fine, D. M., Leach, S. B., Clay, S. E., Eason, B. D., Britt, L. G. and Lamb, K. E. 2017. Breed-specific vertebral heart scale for the dachshund. *J Am Anim Hosp Assoc* 53: 73-79.
10. Bogucki, S. and Noszczyk-Nowak, A. 2015. Short-term heart rate variability (HRV) in healthy dogs. *Pol J Vet Sci* 18: 307-312.
11. Boomsma, F., Bhaggoe, U. M., Man in 't Veld, A. J. and Schalekamp, M. A. 1996. Comparison of N-terminal pro-atrial natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide in human plasma as measured with commercially available radioimmunoassay kits. *Clin Chim Acta* 252: 41-49.
12. Borgarelli, M. and Haggstrom, J. 2010. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40: 651-663.
13. Boswood, A., Dukes-McEwan, J., Loureiro, J., James, R. A., Martin, M., Stafford-Johnson, M., Smith, P., Little, C. and Attree, S. 2008. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 49: 26-32.
14. Boswood, A., Häggström, J., Gordon, S. G., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., Keene, B. W., Bonagura, J., MacDonald, K. A., Patteson, M., Smith, S., Fox, P. R., Sanderson, K., Woolley, R., Szatmári, V., Menaut, P., Church, W. M., O'Sullivan, M. L., Jaudon, J. P., Kresken, J. G., Rush, J., Barrett, K. A., Rosenthal, S. L., Saunders, A. B., Ljungvall, I., Deinert, M., Bomassi, E., Estrada, A. H., Fernandez Del Palacio, M. J., Moise, N. S., Abbott, J. A., Fujii, Y., Spier, A., Luethy, M. W., Santilli, R. A., Uechi, M., Tidholm, A. and Watson, P. 2016. Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: the

- EPIC study-a randomized clinical trial. *J Vet Intern Med* 30: 1765-1779.
15. Bragg, R. F., Bennett, J. S., Cummings, A. and Quimby, J. M. 2015. Evaluation of the effects of hospital visit stress on physiologic variables in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 246: 212-215.
  16. Buchanan, J. W. 1977. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. *Adv Vet Sci Comp Med* 21: 75-106.
  17. Buchanan, J. W. 1999. Prevalence of cardiovascular disorders. In: *Textbook of Canine and Feline Cardiology: Principles and Clinical Practice*, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), WB Saunders, Philadelphia.
  18. Buchanan, J. W. and Bücheler, J. 1995. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc* 206: 194-199.
  19. Campbell, F. E. and Kittleson, M. D. 2007. The effect of hydration status on the echocardiographic measurements of normal cats. *J Vet Intern Med* 21: 1008-1015.
  20. Chan, I. P., Wu, S. Y., Chang, C. C. and Chen, W. Y. 2019. Serial measurements of cardiac troponin I in heart failure secondary to canine mitral valve disease. *Vet Rec* 185: 343.
  21. Chew, D., DiBartola, S. and Schenck, P. 2010. Chronic renal failure. In: *Canine and feline nephrology and urology*, 2nd ed. Saunders, Philadelphia.
  22. Clerico, A., Caprioli, R., Del Ry, S. and Giannessi, D. 2001. Clinical relevance of cardiac natriuretic peptides measured by means of competitive and non-competitive immunoassay methods in patients with renal failure on chronic hemodialysis. *J Endocrinol Invest* 24: 24-30.
  23. Clerico, A., Del Ry, S., Maffei, S., Prontera, C., Emdin, M. and Giannessi, D. 2002. The circulating levels of cardiac natriuretic hormones in healthy adults: effects of age and sex. *Clin Chem Lab Med* 40: 371-377.
  24. Cornell, C. C., Kittleson, M. D., Della Torre, P., Häggström, J., Lombard, C. W., Pedersen, H. D., Vollmar, A. and Wey, A. 2004. Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med* 18: 311-321.

25. Crimmins, D. L. and Kao, J. L. 2011. A 68 residue N-terminal fragment of pro-atrial natriuretic peptide is a monomeric intrinsically unstructured protein. *J Biochem* 150: 157-163.
26. Daniels, L. B. and Maisel, A. S. 2007. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 50: 2357-2368.
27. De Lima, G. V. and Ferreira, F. D. S. 2017. N-terminal-pro brain natriuretic peptides in dogs and cats: a technical and clinical review. *Vet World* 10: 1072-1082.
28. Ebisawa, T., Ohta, Y., Funayama, M., Yamano, S., Mizuno, M., Mizuno, T., Kasuya, A., Sawada, T., Lee, J., Mizukoshi, T. and Uechi, M. 2013. Plasma atrial natriuretic peptide is an early diagnosis and disease severity marker of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Res Vet Sci* 94: 717-721.
29. Engle, S. K. and Watson, D. E. 2016. Natriuretic peptides as cardiovascular safety biomarkers in rats: comparison with blood pressure, heart rate, and heart weight. *Toxicol Sci* 149: 458-472.
30. Eriksson, A. S., Järvinen, A. K., Eklund, K. K., Vuolteenaho, O. J., Toivari, M. H. and Nieminen, M. S. 2001. Effect of age and body weight on neurohumoral variables in healthy Cavalier King Charles spaniels. *Am J Vet Res* 62: 1818-1824.
31. Falk, T., Ljungvall, I., Zois, N. E., Höglund, K., Olsen, L. H., Pedersen, H. D. and Häggström, J. 2013. Cardiac troponin-I concentration, myocardial arteriosclerosis, and fibrosis in dogs with congestive heart failure because of myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 27: 500-506.
32. Fellet, A. L., Arza, P. R., Nuñez, M., Arranz, C. T. and Balaszczuk, A. M. 2011. Hypovolemic state: age-related influence of water restriction on cardiac nitric oxide synthase in rats. *Eur J Nutr* 50: 657-664.
33. Ferasin, L., Crews, L., Biller, D. S., Lamb, K. E. and Borgarelli, M. 2013. Risk factors for coughing in dogs with naturally acquired myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 27: 286-292.

34. Finco, D. R., Brown, S. A., Vaden, S. L. and Ferguson, D. C. 1995. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 18: 418-421.
35. Fonfara, S., Loureiro, J., Swift, S., James, R., Cripps, P. and Dukes-McEwan, J. 2010. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *Vet J* 184: 334-339.
36. Gharbi, N., Mornagui, B., El-Fazaâ, S., Kamoun, A. and Gharib, C. 2004. [Effect of dehydration on nitric oxide, corticotropic and vasopressinergic axis in rat]. *C R Biol* 327: 12-20.
37. Gleadhill, A., 1994. Evaluation of screening tests for renal insufficiency in the dog. *Journal Small Animal Practice* 35: 391-396.
38. Guglielmini, C., Diana, A., Pietra, M., Di Tommaso, M. and Cipone, M. 2009. Use of the vertebral heart score in coughing dogs with chronic degenerative mitral valve disease. *J Vet Med Sci* 71: 9-13.
39. Hanley, J.A. and McNeil, B.J. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143: 29-36.
40. Hansson, K., Häggström, J., Kvarn, C. and Lord, P. 2002. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in Cavalier King Charles Spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 43: 568-575.
41. Hori, Y., Sano, N., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N. and Higuchi, S. 2010. Acute cardiac volume load-related changes in plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in healthy dogs. *Vet J* 185: 317-321.
42. Hori, Y., Yamano, S., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N. and Higuchi, S. 2011. Clinical implications of measurement of plasma atrial natriuretic peptide concentration in dogs with spontaneous heart disease. *J Am Vet Med Assoc* 239: 1077-1083.

43. Häggström, J., Hansson, K., Kwart, C., Pedersen, H. D., Vuolteenaho, O. and Olsson, K. 2000. Relationship between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease. *J Vet Cardiol* 2: 7-16.
44. Häggström, J., Kwart, C. and Pedersen, H.D. 2005. Acquired valvular heart disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine-disease of the dog and cat*, 6th ed. (Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. eds.), Elsevier Saunders, St.Louis.
45. Ichiki, T. and Burnett, J. C. 2017. Atrial natriuretic peptide -Old but new therapeutic in cardiovascular diseases-. *Circ J* 81: 913-919.
46. Imaizumi, T. and Takeshita, A. 1993. Influence of ANP on sympathetic nerve activity and chronotropic regulation of the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 4: 719-729.
47. International. Renal. Interest. Society. 2019. IRIS Staging of CKD (modified 2019). <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html> [accessed on December, 2021].
48. Ishikawa, T., Tanaka, R., Suzuki, S., Saida, Y., Soda, A., Fukushima, R. and Yamane, Y. 2009. Daily rhythms of left atrial pressure in beagle dogs with mitral valve regurgitation. *J Vet Intern Med* 23: 824-831.
49. Itoh, H., Nakao, K., Sugawara, A., Saito, Y., Mukoyama, M., Morii, N., Yamada, T., Shiono, S., Arai, H. and Hosoda, K. 1988. Gamma-atrial natriuretic polypeptide (gamma ANP)-derived peptides in human plasma: cosecretion of N-terminal gamma ANP fragment and alpha ANP. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 429-437.
50. Jepsen-Grant, K., Pollard, R. E. and Johnson, L. R. 2013. Vertebral heart scores in eight dog breeds. *Vet Radiol Ultrasound* 54: 3-8.
51. Johnson, L. 2000. Tracheal collapse. Diagnosis and medical and surgical treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30: 1253-1266.

52. Jung, J. H., Lee, D. H., Cho, Y. I., Chae, Y. J., Jung, Y. J., Kang, K. P. and Kim, W. 2018. Serum nitric oxide level correlates with serum brain natriuretic peptide and whole blood viscosity in hemodialysis patients. *Nitric Oxide* 77: 1-5.
53. Karjalainen, A. H., Ruskoaho, H., Vuolteenaho, O., Heikkinen, J. E., Bäckström, A. C., Savolainen, M. J. and Kesäniemi, Y. A. 2004. Effects of estrogen replacement therapy on natriuretic peptides and blood pressure. *Maturitas* 47: 201-208.
54. Kasamaki, Y., Izumi, Y., Ozawa, Y., Ohta, M., Tano, A., Watanabe, I., Hirayama, A., Nakayama, T., Kawamura, H., Himit, D., Mahemuti, M. and Sezai, A. 2013. Relationship between status of plasma atrial natriuretic peptide and heart rate variability in human subjects. *Heart Vessels* 28: 208-214.
55. Keene, B. W., Atkins, C. E., Bonagura, J. D., Fox, P. R., Häggström, J., Fuentes, V. L., Oyama, M. A., Rush, J. E., Stepien, R. and Uechi, M. 2019. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med* 33: 1127-1140.
56. Kellihan, H. B., Mackie, B. A. and Stepien, R. L. 2011. NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol* 13: 171-182.
57. Kellihan, H. B., Oyama, M. A., Reynolds, C. A. and Stepien, R. L. 2009. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *J Vet Cardiol* 11: 93-97.
58. Koie, H., Kanayama, K., Sakai, T. and Takeuchi, A. 2001. Evaluation of diagnostic availability of continuous ANP assay and LA/AO ratio in left heart insufficient dogs. *J Vet Med Sci* 63: 1237-1240.
59. Kraetschmer, S., Ludwig, K., Meneses, F., Nolte, I. and Simon, D. 2008. Vertebral heart scale in the beagle dog. *J Small Anim Pract* 49: 240-243.
60. Kuss, O., Schumann, B., Kluttig, A., Greiser, K. H. and Haerting, J. 2008. Time domain parameters can be estimated with less statistical error than frequency

- domain parameters in the analysis of heart rate variability. *J Electrocardiol* 41: 287-291.
61. Lalor, S. M., Connolly, D. J., Elliott, J. and Syme, H. M. 2009. Plasma concentrations of natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J Vet Cardiol* 1: 71-79.
  62. Lang, C. C., Choy, A. M., Turner, K., Tobin, R., Coutie, W. and Struthers, A. D. 1993. The effect of intravenous saline loading on plasma levels of brain natriuretic peptide in man. *J Hypertens* 11: 737-741.
  63. Lehmkuhl, L. B., Bonagura, J. D., Biller, D. S. and Hartman, W. M. 1997. Radiographic evaluation of caudal vena cava size in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 38: 94-100.
  64. Luchner, A., Stevens, T. L., Borgeson, D. D., Redfield, M., Wei, C. M., Porter, J. G. and Burnett, J. C. 1998. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol* 274: 1684-1689.
  65. Mac Donald, K. A., Kittleson, M. D., Munro, C. and Kass, P. 2003. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 17: 172-177.
  66. Macready, D. M., Johnson, L. R. and Pollard, R. E. 2007. Fluoroscopic and radiographic evaluation of tracheal collapse in dogs: 62 cases (2001-2006). *J Am Vet Med Assoc* 230: 1870-1876.
  67. Maeda, K., Tsutamoto, T., Wada, A., Mabuchi, N., Hayashi, M., Hisanaga, T., Kamijo, T. and Kinoshita, M. 2000. Insufficient secretion of atrial natriuretic peptide at acute phase of myocardial infarction. *J Appl Physiol* (1985) 89: 458-464.
  68. Magga, J., Vuolteenaho, O., Tokola, H., Marttila, M. and Ruskoaho, H. 1998. B-type natriuretic peptide: a myocyte-specific marker for characterizing load-induced alterations in cardiac gene expression. *Ann Med* 1: 39-45.
  69. Mair, J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide -Where are we now?-. 2008. *Clin Chem Lab Med* 40: 1507-1514.

70. Malcolm, E. L., Visser, L. C., Phillips, K. L. and Johnson, L. R. 2018. Diagnostic value of vertebral left atrial size as determined from thoracic radiographs for assessment of left atrial size in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Am Vet Med Assoc* 253: 1038-1045.
71. Mantis, P., Lamb, C. R. and Boswood, A. 1998. Assessment of the accuracy of thoracic radiography in the diagnosis of canine chronic bronchitis. *J Small Anim Pract* 39: 518-520.
72. Matsunaga, T., Harada, T., Mitsui, T., Inokuma, M., Hashimoto, M., Miyauchi, M., Murano, H. and Shibutani, Y. 2001. Spectral analysis of circadian rhythms in heart rate variability of dogs. *Am J Vet Res* 62: 37-42.
73. Mikawa, S., Nagakawa, M., Ogi, H., Akabane, R., Koyama, Y., Sakatani, A., Ogawa, M., Miyakawa, H., Shigemoto, J., Tokuriki, T., Toda, N., Miyagawa, Y. and Takemura, N. 2020. Use of vertebral left atrial size for staging of dogs with myxomatous valve disease. *J Vet Cardiol* 30: 92-99.
74. Miyagawa, Y., Takemura, N. and Hirose, H. 2010. Evaluation of a single sampling method for estimation of plasma iohexol clearance in dogs and cats with various kidney functions. *J Vet Med Sci* 72: 271-278.
75. Miyagawa, Y., Tominaga, Y., Toda, N. and Takemura, N. 2013. Relationship between glomerular filtration rate and plasma N-terminal pro B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with chronic kidney disease. *Vet J* 197: 445-450.
76. Mochel, J. P., Fink, M., Peyrou, M., Desevaux, C., Deurinck, M., Giraudel, J. M. and Danhof, M. 2013. Chronobiology of the renin-angiotensin-aldosterone system in dogs: relation to blood pressure and renal physiology. *Chronobiol Int* 30: 1144-1159.
77. Muhlbauer, M. C. and Kneller, S. K. 2013. Tracheal collapse syndrome. In: *Radiography of the Dog and Cat: Guide to making and interpreting radiographs*, 1st ed. WB Saunders, Philadelphia.

78. Nakatani, T., Naganuma, T., Masuda, C., Sugimura, T., Uchida, J., Takemoto, Y. and Sugimura, K. 2003. The prognostic role of atrial natriuretic peptides in hemodialysis patients. *Blood Purif* 21: 395-400.
79. Nicolle, A. P., Chetboul, V., Allerheiligen, T., Pouchelon, J. L., Gouni, V., Tessier-Vetzel, D., Sampedrano, C. C. and Lefebvre, H. P. 2007. Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *J Vet Intern Med* 21: 943-949.
80. Nojiri, T., Hosoda, H., Tokudome, T., Miura, K., Ishikane, S., Otani, K., Kishimoto, I., Shintani, Y., Inoue, M., Kimura, T., Sawabata, N., Minami, M., Nakagiri, T., Funaki, S., Takeuchi, Y., Maeda, H., Kidoya, H., Kiyonari, H., Shioi, G., Arai, Y., Hasegawa, T., Takakura, N., Hori, M., Ohno, Y., Miyazato, M., Mochizuki, N., Okumura, M. and Kangawa, K. 2015. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 4086-4091.
81. Nojiri, T. 2018. Correction for Nojiri et al, Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 7883-7886.
82. Nojiri, T., Inoue, M., Yamamoto, K., Maeda, H., Takeuchi, Y., Funakoshi, Y. and Okumura, M. 2012. Effects of low-dose human atrial natriuretic peptide for preventing post-operative cardiopulmonary complications in elderly patients undergoing pulmonary resection for lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 41: 1330-1334.
83. Ogawa, M., Hori, Y., Kanno, N., Iwasa, N., Toyofuku, T., Isayama, N., Yoshikawa, A., Akabane, R., Sakatani, A., Miyakawa, H., Hsu, H. H., Miyagawa, Y. and Takemura, N. 2021. Comparison of N-terminal pro-atrial natriuretic peptide and three cardiac biomarkers for discriminatory ability of clinical stage in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Med Sci* 83: 705-715.
84. Ogawa, M., Ishizaka, M., Akabane, R., Sakatani, A., Nagakawa, M., Miyakawa, H., Miyagawa, Y. and Takemura, N. 2020. Evaluation of the autonomic nervous

- system in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Vet Res Commun* 44: 73-81.
85. Ohno, R., Miyata, H. and Kimura, M. 2009. [Circadian rhythms and effects of anesthesia on plasma natriuretic peptide levels in rats]. *Yakugaku Zasshi* 129: 1529-1535.
86. Ota, K., Kimura, T., Ito, M., Inoue, M., Shoji, M., Shinoda, S., Nagashima, M., Matsui, K., Iitake, K. and Yoshinaga, K. 1987. The effect of short-lasting atrial pacing on the release of atrial natriuretic peptide, vasopressin, and methionine enkephalin in man. *Acta Endocrinol (Copenh)* 116: 235-240.
87. Oyama, M. A., Fox, P. R., Rush, J. E., Rozanski, E. A. and Lesser, M. 2008. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J Am Vet Med Assoc* 232: 1496-1503.
88. Oyama, M. A., Peddle, G. D., Reynolds, C. A. and Singletary, G. E. 2011. Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *J Vet Cardiol* 13: 287-292.
89. Oyama, M. A., Rush, J. E., Rozanski, E. A., Fox, P. R., Reynolds, C. A., Gordon, S. G., Bulmer, B. J., Lefbom, B. K., Brown, B. A., Lehmkuhl, L. B., Prosek, R., Lesser, M. B., Kraus, M. S., Bossbaly, M. J., Rapoport, G. S. and Boileau, J. S. 2009. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 235: 1319-1325.
90. Parfrey, P. S. 2010. BNP in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 954-955.
91. Pattanapon, N., Bootcha, R. and Petchdee, S. 2018. The effects of anesthetic drug choice on heart rate variability in dogs. *J Adv Vet Anim Res* 5: 485-489.
92. Plumb, D. C. 2015. Furosemide. In: *Plumb's veterinary drug handbook*, 8th edition. Wiley-Blackwell, Hoboken.

93. Portaluppi, F., Bagni, B., degli Uberti, E., Montanari, L., Cavallini, R., Trasforini, G., Margutti, A., Ferlini, M., Zanella, M. and Parti, M. 1990. Circadian rhythms of atrial natriuretic peptide, renin, aldosterone, cortisol, blood pressure and heart rate in normal and hypertensive subjects. *J Hypertens* 8: 85-95.
94. Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K. and Dickey, D. M. 2009. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*: 341-366.
95. Prosek, R., Sisson, D. D., Oyama, M. A. and Solter, P. F. 2007. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med* 21: 238-242.
96. Ruth, W., Pedro, O. and Antonia, M. 2018. Electrocardiography. In: *Guide to canine and feline electrocardiography*. Wiley-Blackwell, Hoboken.
97. Reinero, C., Visser, L. C., Kellihan, H. B., Masseau, I., Rozanski, E., Clercx, C., Williams, K., Abbott, J., Borgarelli, M. and Scansen, B. A. 2020. ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med* 34: 549-573.
98. Richards, A. M., Tonolo, G., Fraser, R., Morton, J. J., Leckie, B. J., Ball, S. G. and Robertson, J. I. 1987. Diurnal change in plasma atrial natriuretic peptide concentrations. *Clin Sci (Lond)* 73: 489-495.
99. Rittig, S., Knudsen, U. B., Nørgaard, J. P., Gregersen, H., Pedersen, E. B. and Djurhuus, J. C. 1991. Diurnal variation of plasma atrial natriuretic peptide in normals and patients with enuresis nocturna. *Scand J Clin Lab Invest* 51: 209-217.
100. Ronco, C., Haapio, M., House, A. A., Anavekar, N. and Bellomo, R. 2008. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* 52: 1527-1539.
101. Rubattu, S., Barbato, A., Marchitti, S., Iacone, R., Di Castro, S., Evangelista, A., Stanzione, R., Ippolito, R., Sciarretta, S., Palmieri, L., Volpe, M., Strazzullo, P.

- and Group, O. H. S. R. 2010. Determinants of N-terminal proatrial natriuretic peptide plasma levels in a survey of adult male population from Southern Italy. *J Hypertens* 28: 1638-1645.
102. Ruskoaho, H. 2003. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev* 24: 341-356.
103. Ruskoaho, H., Leskinen, H., Magga, J., Taskinen, P., Mäntymaa, P., Vuolteenaho, O. and Leppäluoto, J. 1997. Mechanisms of mechanical load-induced atrial natriuretic peptide secretion: role of endothelin, nitric oxide, and angiotensin II. *J Mol Med (Berl)* 75: 876-885.
104. Rutten, J. H., Boomsma, F. and van den Meiracker, A. H. 2006. Higher renal extraction of ANP compared with NT-proANP, BNP and NT-proBNP. *Eur J Clin Invest* 36: 514-515.
105. Singh, M. K., Johnson, L. R., Kittleson, M. D. and Pollard, R. E. 2012. Bronchomalacia in dogs with myxomatous mitral valve degeneration. *J Vet Intern Med* 26: 312-319.
106. Szczepankiewicz, B., Pasławska, U., Siwińska, N., Plens, K. and Pasławski, R. 2021. Evaluation of the diagnostic value of the renal resistive index as a marker of the subclinical development of cardiorenal syndrome in MMVD dogs. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 22: 1470320321995082.
107. Takemura, N., Koyama, H., Sako, T., Ando, K., Suzuki, K., Motoyoshi, S. and Marumo, F. 1990. Pharmacokinetics of human alpha-atrial natriuretic peptide (alpha-hANP) in cow and dog. *Nihon Juigaku Zasshi* 52: 165-166.
108. Takemura, N., Koyama, H., Sako, T., Ando, K., Suzuki, K., Motoyoshi, S. and Marumo, F. 1991. Atrial natriuretic peptide in the dog with mitral regurgitation. *Res Vet Sci* 50: 86-88.
109. Tanaka, H., Takano, K., Iijima, H., Kubo, H., Maruyama, N., Hashimoto, T., Arakawa, K., Togo, M., Inagaki, N. and Kaku, K. 2017. Factors affecting canagliflozin-induced transient urine volume increase in patients with type 2

- diabetes mellitus. *Adv Ther* 34: 436-451.
110. Tapolyai, M., Faludi, M., Réti, V., Lengvárszky, Z., Szarvas, T., Fülöp, T., Bekó, G. and Berta, K. 2013. Volume estimation in dialysis patients: the concordance of brain-type natriuretic peptide measurements and bioimpedance values. *Hemodial. Int.* 17: 406-412.
  111. Tappin, S. W. 2016. Canine tracheal collapse. *J Small Anim Pract* 57: 9-17.
  112. Tarnow, I., Olsen, L. H., Kwart, C., Hoglund, K., Moesgaard, S. G., Kamstrup, T. S., Pedersen, H. D. and Häggström, J. 2009. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J* 180: 195-201.
  113. Tarvainen, M. P., Niskanen, J. P., Lipponen, J. A., Ranta-Aho, P. O. and Karjalainen, P. A. 2014. Kubios HRV-heart rate variability analysis software. *Comput Methods Programs Biomed* 113: 210-220.
  114. Thibault, G., Charbonneau, C., Bilodeau, J., Schiffrin, E. L. and Garcia, R. 1992. Rat brain natriuretic peptide is localized in atrial granules and released into the circulation. *Am J Physiol* 263: 301-309.
  115. Thibault, G., Murthy, K. K., Gutkowska, J., Seidah, N. G., Lazure, C., Chrétien, M. and Cantin, M. 1988. NH<sub>2</sub>-terminal fragment of rat pro-atrial natriuretic factor in the circulation: identification, radioimmunoassay and half-life. *Peptides* 9: 47-53.
  116. Toth, M., Vuorinen, K. H., Vuolteenaho, O., Hassinen, I. E., Uusimaa, P. A. Leppaluoto, J. and Ruskoaho, H. 1994. Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am J Physiol* 266: 1572-1580.
  117. Toyoshima, Y., Suzuki, S., Awal, M. A., Matsumoto, M., Nishinakagawa, H., Mifune, H. and Honda, J. 1996. Atrial natriuretic peptide (ANP)-granules of auricular cardiocytes in dehydrated and rehydrated mice. *Exp Anim* 45: 135-140.
  118. Van Kimmenade, R. R. and Januzzi, J. L. 2009. The evolution of the natriuretic peptides -Current applications in human and animal medicine-. *J Vet Cardiol* 11 Suppl 1: 9-21.

119. Varga, B., Gergely, A., Galambos, Á. and Kis, A. 2018. Heart rate and heart rate variability during sleep in family dogs (*Animals (Basel)* 8: 107).
120. Vesely, D. L. 1995. Atrial natriuretic hormones originating from the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 108-114.
121. Vollmar, A. M., Montag, C., Preusser, U., Kraft, W. and Schulz, R. 1994. Atrial natriuretic peptide and plasma volume of dogs suffering from heart failure or dehydration. *Zentralbl Veterinarmed A* 41: 548-557.
122. Walsh, K. P., Williams, T. D., Spiteri, C., Pitts, E., Lightman, S. L. and Sutton, R. 1988. Role of atrial pressure and rate in release of atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 254: 607-610.
123. Walther, T., Stepan, H., Pankow, K., Gembardt, F., Faber, R., Schultheiss, H. P. and Siems, W. E. 2004. Relation of ANP and BNP to their N-terminal fragments in fetal circulation: Evidence for enhanced neutral endopeptidase activity and resistance of BNP to neutral endopeptidase in the fetus. *BJOG* 111: 452-455.
124. Wehner, A., Hartmann, K. and Hirschberger, J. 2008. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Vet Rec* 162: 141-147.
125. Winters, C. J., Sallman, A. L., Baker, B. J., Meadows, J., Rico, D. M. and Vesely, D. L. 1989. The N-terminus and a 4,000-MW peptide from the midportion of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone each circulate in humans and increase in congestive heart failure. *Circulation* 80: 438-449.
126. Wolfram, G., Sitter, T., Gottsmann, M., Gerzer, R. and Schiffel, H. 1996. Assessment of dry weight in haemodialysis patients by the volume markers ANP and cGMP. *Nephrol Dial Transplant* 2: 28-30.

## 謝辞

本論文を終えるにあたり、終始多大なるご指導・ご鞭撻を賜り、そして獣医循環器病学および腎泌尿器学をはじめとした内科学についてご教示いただいた日本獣医生命科学大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准教授に心より感謝申し上げます。

本論文の執筆に際し、検体収集にご協力をいただいた獣医放射線学研究室の藤田道郎教授および藤原亜紀准教授、そして様々なご助言をいただいた当研究室の卒業生である赤羽根僚太先生および酒谷篤先生に感謝いたします。

本研究の実施に際し、多くのご協力をいただいた当研究室大学院生の宮川寛済先生、許准助先生、ならびに当研究室の卒業生である河原咲先生、今田舞先生、進藤凧沙先生、高谷渉先生、長川雅佳先生、中澤可奈先生、中村文香先生、中村理紗先生、鍋嶋健太郎先生、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、石坂美緒先生、加藤安美先生、川村彩乃先生、後藤智紗子先生、澤崎まゆり先生、塩住友哉先生、長谷由貴先生、上野詩音先生、大木遥先生および後藤絵里先生、そして当研究室の室員である吉田将汰さん、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、片桐啓輔さん、重信あみさん、野原はづきさん、畠山真悠子さん、平田和樹さん、鈴木琴奈さん、田代康平さん、中野真唯さん、名倉愛紗香さん、柳井優里さん、山森百合香さん、吉村あかりさん、内田拓夢さん、小川亮さん、清水幸奈さん、山下美悠さんおよび横倉千恵さんに厚く御礼申し上げます。また、本論文を執筆するにあたり、様々なご助言を賜りました当研究室の大学院特別研究生である戸田典子先生、そして同研究室の研究生である徳力剛先生に心から感謝いたします。

そして、本学に入学以来、経済的かつ精神的に支えて続けてくれた両親および祖父母に心から感謝いたします。

最後に、本研究の供試動物、そして多くのことを教えて頂いたすべての動物たちに深く感謝するとともに、こうした研究成果が疾患に罹患した動物たちの治療および診断に役立つことを願います。