

心疾患に罹患したイヌおよびネコの  
血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の  
診断的意義に関する研究

The diagnostic significance of  
plasma N-terminal pro-B type natriuretic peptide concentration  
in dogs and cats with cardiac diseases

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程平成 22 年入学

富永芳昇

(指導教授：竹村直行)

## 目次

第1章	序論	1
第2章	イヌおよびネコの血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の測定内および測定間変動の評価	6
1.	緒言	7
2.	材料および方法	7
3.	結果	9
4.	考察	11
5.	小括	13
第3章	臨床的に健康なイヌおよびネコにおける血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の日内および週間変動、そして食事および運動の影響の評価	14
1.	緒言	15
2.	材料および方法	15
3.	結果	17
4.	考察	25
5.	小括	27
第4章	血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度に対する糸球体ろ過量の影響の評価	28
1.	緒言	29
2.	材料および方法	29
3.	結果	32
4.	考察	44
5.	小括	45
第5章	僧帽弁閉鎖不全症に罹患したイヌにおける血漿 N 中末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の診断的意義の検討	46
1.	緒言	47
2.	材料および方法	49
3.	結果	50
4.	考察	66
5.	小括	68

第6章 肥大型心筋症に罹患したネコにおける血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の診断的意義の検討	70
1. 緒言	71
2. 材料および方法	72
3. 結果	73
4. 考察	82
5. 小括	85
第7章 総括	87
謝辞	93
参考文献	94
英文要約	109

# 第 1 章

## 序論

うっ血性心不全 (CHF)は、イヌおよびネコの主要な死亡原因の一つであり、その発生率は加齢と共に増加する [61, 81]。近年、獣医療の発展および栄養学の進歩により、コンパニオン・アニマルの寿命が延長している。このことより、イヌおよびネコの CHF の罹患率は今後も増加すると予想される。

CHF は、心血管系の代償機構を上回る重篤な収縮能および/または拡張能の異常をもたらす心疾患による末期像として定義されている [119]。CHF は安静時または運動時に、うっ血 (肺水腫、腹水、胸水)や末梢循環減少 (低心拍出量) などをもたらす [119]。CHF に陥った動物の予後は一般的に不良であり、比較的短期間のうちに死亡することが多い [38]。臨床現場で心疾患を的確に診断し、その経過を評価することは、心疾患に罹患した動物の QOL を維持していく上で重要である。

最も一般的なイヌの心疾患の一つが僧帽弁の粘液腫様変性に伴う僧帽弁閉鎖不全症 (MVI)で、北米ではイヌの後天性心疾患の 75 %を占めると報告されている [11]。ネコの代表的な心疾患は心筋症である。ネコの心筋症は、肥大型心筋症 (HCM)、拘束型心筋症、拡張型心筋症、不整脈原性右室心筋症、分類不能型心筋症に分類されている。このうち HCM はネコの心筋症の 58 - 68 %を占め、発生頻度が最も高い [32, 61, 93]。MVI に罹患したイヌおよび HCM に罹患したネコは CHF に至ることが多い。

一般的に、イヌおよびネコの心疾患の診断は、問診および身体検査によって心疾患を疑う所見または心疾患の進行を疑う所見が認められた症例を対象に、心電図検査、胸部 X 線検査および心エコー図検査といった臨床検査を実施して行われる。イヌの MVI では心雑音が聴取されるため、検出が比較的容易であり、臨床検査へと進むことが可能である。しかし、HCM に罹患したネコでは心雑音が聴取されないこともあるため検出が困難である [11, 93]。そのため、HCM に罹患しているにも関わらず心疾患が疑われず重症化するまで発見されないことがある。このため、心エコー図検査よりも簡便に心臓病をスクリーニングできる検査、換言すると、心エコー図検査のような心臓の詳細な検査の必要性を判定するための検査が必要だと思われる。

ヒトの医療では、心疾患のスクリーニング検査の一つとしてバイオマーカーが利用されている。イヌおよびネコでは、ナトリウム利尿ペプチドファミリー

に属する心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)および N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)がバイオマーカーとして重要視されている [115]。このうち、BNP は主に心室で合成される 32 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、心臓への容量負荷およびまたは圧負荷、心筋肥大および低酸素などの刺激に反応し心筋組織で産生され、血中に放出される。また、BNP はノルエピネフリンおよびアンギオテンシン II の放出に伴って分泌されることが知られている [87]。BNP は主に心筋内でプレプロホルモンとして産生され、最初にプロホルモンである proBNP へとプロセッシングを受ける。さらに proBNP は血中に分泌される際に、プロセッシングを受け、生理作用を示す活性型の BNP および非活性型の NT-proBNP へと変化する [87]。循環中の BNP はナトリウム利尿ペプチド受容体と結合し、グアニルシクラーゼを介して cGMP が産生され、様々な生理作用を発現するとともに分解される。ナトリウム利尿ペプチド受容体には A、B および C のサブタイプがあり、心臓、血管平滑筋および腎臓に多く分布している。BNP は ANP よりもナトリウム利尿ペプチド受容体との親和性が低いため、ANP の血中半減期は多くの動物種で短くイヌはヒトと同様で 1~4 分である [103]。しかし、BNP の血中半減期は動物種によって異なり、ヒトでは 22 分であるのに対し、イヌでは 1~2 分と ANP のそれとほぼ同様である [110]。それに対して、NT-proBNP の血中半減期は 120 分と長いことが報告されている [36, 63, 75, 95, 117]。その理由として、BNP および NT-proBNP の血中での代謝経路が異なることが挙げられる [117]。BNP はナトリウム利尿ペプチド受容体-A に結合し細胞内に取り込まれる、クリアランス受容体であるナトリウム利尿ペプチド受容体-Cに取り込まれる、さらにプロテアーゼの一つである中性エンドペプチダーゼによる分解を受ける、そして腎臓の尿細管刷子縁にて非特異的な分解を受けることにより代謝されている [18]。それに対して、NT-proBNP はナトリウム利尿ペプチド受容体とは結合せず、クリアランス受容体に取り込まれることもなく、そして中性エンドペプチダーゼによる分解も受けない。そのため、NT-proBNP のクリアランスは腎臓でのみ行われている [115]。以上のことから、NT-proBNP は BNP と比べて採血後の安定性が良好であり、長期的な心臓への負荷を評価可能であり、臨床的に有用なバイオマーカーとして注目されている。

ヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は、CHF の除外または診断の補助 [8, 106]、無徴候の左室機能不全の患者のスクリーニング [42]、心不全の発症および死亡リスクの階級化 [105]、治療方針を決定する際の判断材料の一つとして [31, 50]測定されている。また、イヌでは血漿中 NT-proBNP 濃度は、原因不明の呼吸器徴候の原因が心臓性であるかどうかを高い感度および特異度をもって鑑別可能である [34, 83]。また、MVI に罹患したイヌでは、その重症化に伴い濃度が上昇し、約 80 - 90 %の感度および特異度をもって CHF のイヌを検出可能であり [82, 104]、さらに、CHF の発症や死亡の予測因子の一つとしても有用であることが知られている [19, 74]。一方、CHF のネコでは、血漿中 NT-proBNP 濃度が健康な群と比べて有意に高値を示す [35, 46, 125]。その後、血漿中 NT-proBNP 濃度は、無徴候の HCM または拘束型心筋症に罹患したネコを 100 %の感度および 89 %の特異度をもって検出可能であること [22]、イヌと同様に原因不明の呼吸器徴候の原因の鑑別に有用であることが報告されている [23, 35, 95, 101]。このように、イヌおよびネコの両方で血漿中 NT-proBNP 濃度の有用性が多く報告されているが、血漿中 NT-proBNP 濃度に影響を与える要因もまた報告されている。ヒトで血漿中 NT-proBNP 濃度は、肥満 [45, 108, 113]、肺塞栓症による肺高血圧症 [28]、敗血症 [100]および甲状腺機能亢進症 [84]に伴って上昇する。さらに、加齢により上昇し、男性より女性の方が高値を示す [91]。イヌで血漿中 NT-proBNP 濃度は、高窒素血症を伴う腎不全で上昇し [89, 96]、健康な同一個体から 1 週間ごとに採血し、血漿中 NT-proBNP 濃度を測定すると、有意ではないが大きな変動が認められることも報告されている [52]。ネコでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は高血圧、甲状腺機能亢進症、高窒素血症を伴う腎不全に伴って上昇する [58, 69]。さらに、血漿中 NT-proBNP 濃度に関する報告には、その測定に否定的な報告も存在する。イヌでは、特にそのスクリーニング検査としての有用性は否定的であり、ドーベルマン・ピンシャーを対象にした研究では、血漿中 NT-propBNP 濃度単独で潜在的な拡張型心筋症を検出する感度および特異度は、それぞれ 81.1 および 75.0%と十分でなかった [121]。ネコでは、対照ネコと HCM に罹患したネコで血漿中 NT-proBNP 濃度に有意差が認められなかったとの報告もある [62]。これらの報告のため、血漿中 NT-proBNP 濃度の臨床的意義が一部混乱してい

ると考えられている。この原因として、イヌおよびネコでの変動要因が十分に検討されていないことが挙げられると思われる。

そこで、本研究は第 2 章においてイヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度に影響を与える要因を検討し、イヌおよびネコで多発する心疾患での血漿中 NT-proBNP 濃度の適切な利用法を検証することを目的とした。すなわち、生体に由来しない変動要因として血漿中 NT-proBNP 濃度の測定内変動および測定間変動について綿密に評価した。続いて第 3 章では、臨床的に健康なイヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動、食事および運動の影響について評価し、さらに第 4 章では血漿中 NT-proBNP 濃度に対する糸球体ろ過量の影響について評価した。そして、第 5 章では第 2 章から第 4 章での評価を総合的にまとめて、MVI に罹患したイヌにおける血漿中 NT-proBNP 濃度の臨床的意義を検討し、最後に第 6 章として HCM に罹患したネコでの血漿中 NT-proBNP 濃度の臨床的意義について評価した。

## 第 2 章

イヌおよびネコの血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム  
利尿ペプチド濃度の測定内および測定間変動の評価

## 1. 緒言

現在、イヌおよびネコの血漿 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)濃度は、NT-proBNP を特異的に検出する特異抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法により測定されている。日本国内では、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の測定は、IDEXX LABORATORIES 株式会社 (東京都, 日本)のみが受注している。検体を送付する前のサンプル処理条件はイヌでは採血時にエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)を添加し遠心分離後の血漿とすること、一方ネコではイヌと同様の処理を施し、さらに得られた血漿にプロテアーゼインヒビターの 1 種であるアプロチニンを添加することが推奨されている (ネコでは NT-proBNP の測定系の改良により、2013 年 10 月以降はイヌと同様に EDTA による処理のみでこの血漿濃度が測定可能となった。本章の評価はこの改良以前に実施されたものである)。

ついで、同一個体で複数回にわたって血漿中 NT-proBNP 濃度を測定し、その値に変動が見られた場合は、生体に由来する変動、測定に起因する変動という 2 つの可能性が挙げられる。さらに、測定に伴う変動は測定内変動および測定間変動に分類され、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度では、これらの変動に関する情報がこれまでない。そこで本章では、イヌおよびネコにおける血漿濃度の測定内変動および測定間変動について評価した。加えて、ネコで推奨されているアプロチニンの添加がこれらの変動に及ぼす影響についてイヌおよびネコで評価した。

## 2. 材料および方法

本学獣医内科学教室第二にて管理されていたイヌ 5 頭およびネコ 5 頭を用いた。本実験に用いたイヌおよびネコのプロフィールを表 1 に示した。

表 1. 供試動物の品種、年齢、性別、体重および併発疾患

		品種	年齢 (齢)	性別	体重 (kg)	併発疾患
イヌ	No. 1	ビーグル	3	雌	8.5	-
	No. 2	ビーグル	1	雌	8.1	-
	No. 3	ビーグル	4	雌	9.3	-
	No. 4	ビーグル	15	避妊雌	9.6	乳腺腫瘍
	No. 5	ビーグル	14	避妊雌	9.8	生理的 MR、乳腺腫瘍
ネコ	No. 1	雑種	1	雄	3.4	-
	No. 2	雑種	1	雌	4.2	-
	No. 3	雑種	8	避妊雌	3.4	-
	No. 4	雑種	10	雌	2.9	慢性腎不全
	No. 5	雑種	13	雌	3.1	慢性腎不全

MR: 僧帽弁逆流

各供試動物の頸静脈から採血し、EDTA (血液 1 ml 当たり 1.5 mg 添加) と混合した後に 4°C で 30 分静置した。3000rpm にて 10 分間遠心後、血漿を分離した。分離した血漿を 2 等分し、それぞれ測定内変動および測定間変動の評価に用いた。それぞれの血漿をさらに 10 等分し、測定まで -30 °C で保存した。測定内変動の評価では、10 等分した測定内変動用の血漿を全て同時に測定した。血漿中 NT-proBNP 濃度の平均および標準偏差 (SD) を求め、これらから変動係数 (CV) を算出した。測定間変動の評価では、10 等分した測定間変動用の血漿を 1 日以上の間隔を空けて 10 回測定した。測定内変動と同様、血漿中 NT-proBNP 濃度の平均、SD および CV を算出した。続いて、採血から 1 ヶ月の間隔を空け、同じ動物から同じ方法で採血した。その後、血漿を分離するまでのサンプルの取り扱いは上述と同様とした。遠心分離後の血漿をアプロチニン (血漿 1 ml 当たり 500 kIU 添加) が添加されているチューブに移し、十分に混和後、上述したように分注および保存し、血漿中 NT-proBNP 濃度を測定した。そして測定内変動および測定間変動を評価するためにそれぞれの CV を算出した。

血漿中 NT-proBNP 濃度は、サンドウィッチ ELISA 法を用いたキット (Cardiopet™ proBNP)により測定した。この測定系では、イヌおよびネコの NT-proBNP に対して特異的な 2 か所の免疫親和性を持つ精製されたヒツジ抗体が用いられている。全ての測定は IDEXX LABORATORIES 株式会社に依頼し行った。測定法を要約すると、抗 NT-proBNP 捕獲抗体がプレートの各ウェルに固定されており、トレーサーは検出抗体であるセイヨウワサビペルオキシダーゼと結合させた抗 NT-proBNP を含んでいた。凍結乾燥した標準液を 0.3 ml の蒸留水により溶解し、室温で 30 分間静置した。各標準液およびサンプルを各ウェルに 20 $\mu$ l ずつ加え、200 $\mu$ l のトレーサーを全てのウェルに加えた。次に、暗所で 16 - 24 時間、室温でインキュベートし、希釈した洗浄緩衝液でウェルを洗浄した。残った洗浄緩衝液を全て除去し、200 $\mu$ l の基質を全てのウェルに加え十分に混合した。そのプレートを暗所にて室温で 30 分間インキュベートし、その後、全てのウェルに 50 $\mu$ l の停止液を添加し、その直後に 450nm で吸光度を測定した。この測定系による測定限界値はイヌでは 50 pmol/L、そしてネコでは 24 pmol/L であったため、この値未満の血漿中 NT-proBNP 濃度はそれぞれ 50 および 24 pmol/L として解析した。また、測定は全て同一測定者が実施した。

分布データの正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定を用いた。測定内変動および測定間変動の程度の評価には CV を用いた。血漿に EDTA のみを加えた場合の CV と EDTA およびアプロチニンを加えた場合の CV の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。測定間変動は、測定日毎の CV を Bonferroni 補正法を用いた Wilcoxon の符号付き順位検定により解析した。P < 0.05 を有意とした。結果は特に明記しない限り、数値は中央値 (最小値 - 最大値)で示した。統計解析は市販のソフトウェア (Dr. SPSSII for Windows, Version 11.0, 1J, SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan)を用いて実施した。

### 3. 結果

イヌおよびネコの血漿に EDTA のみを添加したサンプル、そして EDTA およびアプロチニンを添加したサンプルの血漿中 NT-proBNP 濃度およびその CV をそれぞれ表 2 および 3 に示した。

表 2. イヌでの各サンプル処理方法による測定内および測定間変動の血漿中 NT-proBNP 濃度および変動係数 (CV)

	測定内変動				測定間変動			
	EDTA		EDTA + アプロチニン		EDTA		EDTA + アプロチニン	
	血漿中 NT-proBNP 濃度	CV						
No. 1	203.1	22.0	192.0	8.2	148.4	27.7	148.3	20.2
No. 2	304.2	14.8	224.0	5.7	261.3	17.3	227.3	44.9
No. 3	347.1	11.4	279.0	14.7	273.6	19.9	232.5	21.5
No. 4	417.8	8.3	315.3	21.9	287.4	27.6	249.7	20.7
No. 5	633.3	5.7	493.0	11.4	568.6	13.9	424.8	25.6
中央値	347.1	11.4	279.0	11.4	273.6	19.9	232.5	21.5

(単位: 血漿中 NT-proBNP 濃度 [pmol/L]、CV: [%])

表 3. ネコでの各サンプル処理方法による測定内および測定間変動の血漿中 NT-proBNP 濃度および変動係数 (CV)

	測定内変動				測定間変動			
	EDTA		EDTA + アプロチニン		EDTA		EDTA + アプロチニン	
	血漿中 NT-proBNP 濃度	CV						
No. 1	24.5	5.2	24.0	0	24.0	0	27.3	18.1
No. 2	24.8	8.8	24.0	0	26.1	13.5	28.3	32.3
No. 3	24.9	11.0	24.0	0	31.1	38.6	40.6	34.9
No. 4	121.5	10.6	224.9	24.8	171.8	16.9	274.7	20.5
No. 5	604.9	17.0	848.6	12.9	1122.3	24.1	1137.2	29.5
中央値	24.9	10.6	24.0	0	31.1	16.9	40.6	29.5

(単位: 血漿中 NT-proBNP 濃度 [pmol/L]、CV: [%])

測定内変動では、EDTAのみを添加したサンプル、EDTAおよびアプロチニンを添加したイヌのサンプルのCVは、それぞれ11.4(5.7 - 22.0)および11.4(5.7 - 21.9)%であり、両者に有意差は認められなかった。EDTAのみを添加したサンプル、そしてEDTAおよびアプロチニンを添加したネコのサンプルのCVは、10.6(5.2 - 17.0)および0(0 - 24.8)%であり、両者の間に有意差は認められなかった。

測定間変動では、EDTAのみを添加したサンプル、そしてEDTAおよびアプロチニンを添加したイヌのサンプルのCVは、それぞれ19.9(13.9 - 27.7)および21.5(20.2 - 44.9)%で両者に有意差は認められなかった。EDTAのみを添加したサンプル、そしてEDTAおよびアプロチニンを添加したネコのサンプルのCVは、16.9(0 - 38.6)および29.5(18.1 - 34.9)%であり、両者の間に有意差は認められなかった。また10回の測定日間の血漿中NT-proBNP濃度に有意差は認められなかった(全て $P > 0.05$ )。

#### 4. 考察

EDTAのみを添加した血漿でのNT-proBNP濃度の測定内変動は、イヌでは11.4%、一方ネコでは10.6%であった。これらの値はヒトでの値(1.6、2.7%)と比べると高値であったが[68, 123]、イヌおよびネコの血漿中NT-proBNP濃度の測定変動に関する別の報告では、測定内変動はそれぞれ13.2および9.1%と[21, 122]、本検討で得られた結果とほぼ同じだった。したがって、本研究の測定内変動のCVはイヌおよびネコの血漿中NT-proBNP濃度の測定で一般的な値であると判断した。

測定間変動のCVは、イヌでは19.9%、またネコでは16.9%と測定内変動よりも高い値であった。一般に、測定間変動は測定内変動よりも高い。それは測定間変動では、測定に用いる抗体、標識物質および標準薬品の変性や試薬量の不一致、サンプルの保存条件などの多くの要因の影響を受けやすいためであると考えられており、本章の試験結果からも、上記のいずれかの要因が原因となって測定間変動が上昇したと考えられたが、生体に由来しない変動であると考えられた。

既に述べたように、本検討の測定内および測定間変動のCVは、ヒトでの結

果と比べて明らかに高かった。ヒトの血漿中 NT-proBNP は、凍結再融解 [29]、室温で 7 日間および 4℃で 11 日間の放置 [6]、-20℃で 120 日間の保存 [77]でも安定性を示すことが報告されている。しかし、イヌの血漿を採取後に凍結し、測定前に室温で融解して 24 時間以内に血漿中 NT-proBNP 濃度を測定した場合、凍結せずに測定したサンプルよりも高値を示し、24 時間以上放置すると低値を示すことが報告されており、より正確に測定するためには、血漿の採取から測定までの処理および保存の条件を一定にすることが重要であるとされている [21]。一方、ネコの血漿についてはこのような検討は実施されていないが、本検討におけるネコの測定内および測定間変動はイヌのそれと近似していることから、血漿中 NT-proBNP および測定に用いる試薬等の安定性は、イヌの測定結果と同程度であると予測された。血漿中 NT-proBNP 濃度の測定値の安定性は、血漿中での NT-proBNP の安定性、測定に用いる抗体の特異性に依存することから、ヒトの血漿中 NT-proBNP 濃度の測定内および測定間変動と比べてイヌおよびネコの測定値が高かった原因は、イヌおよびネコの血漿中の NT-proBNP の安定性がヒトよりも低いこと、本研究で用いた抗体の特異性がヒトでの測定で用いられている抗体より低いことなどであると考えられた。

EDTA およびアプロチニンを添加したサンプルを用いた際の測定内および測定間変動は、イヌおよびネコの両方で、EDTA のみを添加したサンプルの測定内および測定間変動と比べて有意な変化は認められなかった。このことは、血漿中 NT-proBNP 濃度測定のためのサンプル処置に、アプロチニンの添加が必須でないことを示している。さらに、本検討では EDTA のみを添加したサンプルでは、EDTA およびアプロチニンを添加したサンプルと比べて測定内および測定間変動はともに低い傾向を示した。ヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度を測定する際は、EDTA のみを添加されたサンプルが用いられており、アプロチニンは添加されていない。それは、B 型ナトリウム利尿ペプチドはプロテアーゼの一つである中性エンドペプチダーゼによる分解を受けるため、アプロチニンの添加が必要であると考えられていると考えられているが [18, 25]、ヒトの NT-proBNP はその分解を受けないためこの添加が行われていない [117]。このような、NT-proBNP の特性を踏まえると、本章で示した測定値にアプロチニンの添加が影響を与えなかったという結果は、妥当であったと考えられた。

本章での検討により、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の測定値の測定内および測定間変動は約 20 %であることが明らかとなった。同一個体で連続的に測定した血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈する場合、20 %未満の変動は生体に由来しない測定変動と判断すべきであると考えられた。また、過去の報告および本章での検討結果に基づき、今後の検討では、NT-proBNP 濃度の測定に用いるサンプルは以下の手順で処理を行うことが望ましいことが明らかになった。

- 採血した血液を、EDTA と混合した後に 4℃で 30 分静置する。
  - その後、3000rpm にて 10 分間遠心分離する。
  - 分離した血漿は、アプロチニンを添加せずに測定まで-30℃で保存する。
- このようにサンプル処理法を統一することで、測定に伴う変動を低く抑えることが可能であると考えられた。

## 5. 小括

本章では、血漿中 NT-proBNP 濃度の測定内変動および測定間変動を評価した。加えて、血漿サンプル処理時のアプロチニン添加の必要性も評価した。

その結果、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度のこれらの変動は、ヒトと比較すると約 20 %と高かったが、イヌおよびネコでの他の報告と比較すると、同等の変動であった。この結果に基づき、同一個体で連続的に測定した血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈する場合、20 %未満の変動は生体に由来しない測定変動と判断する必要があることが明らかになった。加えて、測定変動はアプロチニン添加によって低下することはなく、EDTA のみを添加したサンプルの方が CV が低い傾向を示したことより、アプロチニン添加のメリットはないと判断した。このことから、本研究で血漿中 NT-proBNP 濃度の測定に用いるサンプルの処理は以下のように統一することが望ましい。

- 採血した血液を、EDTA と混合した後に 4℃で 30 分静置する。
- その後、3000rpm にて 10 分間遠心分離する。
- 分離した血漿は、アプロチニンを添加せずに測定まで-30℃で保存する。

以上のようにサンプル処理法を統一することで、測定に伴う変動を低く抑えることが可能であることが明らかになった。

## 第3章

臨床的に健康なイヌおよびネコの血漿中 N 末端  
proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の日内および  
週間変動、そして食事および運動の影響の評価

## 1. 緒言

健康または心不全のヒトでは、血漿および血清 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)濃度は、9.1 - 33.3 %の個体内変動を示すことが報告されている [68, 123]。この個体内変動は心疾患を検出する際に、偽陽性および偽陰性の原因となる [124]。個体内変動の原因として、B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)および NT-proBNP の分泌量および排泄の変動を挙げることができる。実際に、食事、水分摂取量、運動および腎機能の低下は全て血漿中 NT-proBNP 濃度を上昇させることがヒトで確認されている [80, 124]。これに対して動物では、正常なイヌの 60 %で 100 pmol/L 以上の週間変動が存在していることが報告されているが [52]、イヌおよびネコでは個体内変動は調査されていない。この変動は、血漿中 NT-proBNP 濃度を測定する際に採血時刻を統一するべきかを決定する上で重要である。また、同一個体で連続的に測定した血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈する場合、個体内変動の有無および程度は重大な影響を及ぼすと考えられる。

心疾患のヒトでは、運動によって血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇するため、運動の影響を除外するために検査前には運動を制限する必要がある [80, 124]。また正常なイヌでは、食事により一過性に血圧および心拍数が上昇する [79]。ヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は血圧および年齢とも関連するため、イヌでも食事による心作業能の一過性の上昇が血漿中 NT-proBNP 濃度に影響する可能性があり、この可能性を検定することは重要である [13, 27]。しかし、血漿中 NT-proBNP 濃度に対する運動および食事の影響は、イヌでは検討されていない。一般臨床現場では、動物が歩いてまたは走って来院したり、あるいは食物摂取を済ませて来院することが非常に多い。このため、運動および食事に伴う血漿中 NT-proBNP 濃度の影響を評価することで、血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義をより高めることができる可能性がある。そこで本章では、臨床的に健康なイヌおよびネコにおける血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動および週間変動を調査し、加えて臨床的に健康なイヌでの血漿中 NT-proBNP 濃度に対する食事および運動の影響を評価することを目的とした。

## 2. 材料および方法

本学獣医内科学教室第二で管理されていたイヌ 7 頭およびネコ 5 頭を用いた。各供試動物のプロフィールを表 1 に示した。

表 1. 供試動物のプロフィール

		品種	年齢 (齢)	体重 (kg)	性別
イヌ	No.1	ビーグル	1	9.7	雌
	No.2	ビーグル	2	9.3	雌
	No.3	ブリュッセル・グリフォン	1	5.0	雄
	No.4	雑種	2	3.0	雌
	No.5	ビーグル	4	9.0	雌
	No.6	ビーグル	14	9.8	避妊雌
	No.7	ビーグル	1	11.5	雌
ネコ	No.1	雑種	10	4.2	雌
	No.2	雑種	2	4.6	雄
	No.3	雑種	2	5.1	雄
	No.4	雑種	2	2.9	雌
	No.5	雑種	2	3.4	雌

実験前に実施した身体検査、完全血球計算、血液生化学検査および心エコー図検査の結果に基づいて、これらの供試動物の全てが臨床的に健康と判断された。これらの供試動物を用いて 3 種類の実験を行った。

実験 1 では、日内変動の存在を調査するため、供試動物から 10:30、13:30、16:30、19:30、22:30、翌日の 1:30、4:30 および 7:30 に約 1 ml ずつ採血を行った。供試動物は採血時以外はケージ内に収容し、照明は 24 時間明期とした。食事 (イヌ: ROYAL CANIN Vets Plan SELECT SKIN CARE、ネコ: ROYAL CANIN Vets Plan メールケア) は 8 時および 20 時に給与し、体重から求めた 1 日カロリー要求量の半分をそれぞれの時刻に与え、飲水は自由とした。採血は週に 1 回、同じ曜日に 3 週連続で実施した。その後、各採血時刻の血漿中 NT-proBNP 濃度の平均を求め、これを各時刻の血漿中 NT-proBNP 濃度とし日内変動を評価した。また、各採血日の 1 日を通じた血漿中 NT-proBNP 濃度の平均および標準偏差 (SD) から変動係数 (CV) を算出した。各採血日の血漿中 NT-proBNP 濃度の平均では週間変動の有無を評価し、CV を用いて週間変動の程度を評価した。

実験 2 は、食事が血漿中 NT-proBNP 濃度に及ぼす影響を評価することを目的に実験 1 が終了した 1 週間後に行った。表 1 に示したイヌを 12 時間絶食させた後に採血し、実験 1 と同じ食事を同量与えた。そして、食事を全量採食してから 5、15、30、60、120 および 180 分後に採血を行った。以上の採血を 3 日毎に 3 回実施した。そして、各採血時刻の血漿中 NT-proBNP 濃度の平均を求め、食事前後の変動の有無を評価した。また、各採血日の血漿中 NT-proBNP 濃度の平均および SD より算出した CV で食事前後の血漿中 NT-proBNP 濃度の変動の程度を評価した。

実験 3 は運動が血漿中 NT-proBNP 濃度に及ぼす影響を評価することを目的に、実験 2 が終了した 3 日後に実施した。15 時間の絶食後に採血し、ヒトが歩行する程度の速度で 15 分間イヌを歩行させた。そして、歩行が終了して 5、15、30、60、120 および 180 分後に採血を行った。以上の採血を 3 日毎に 3 回実施した。そして、各採血時刻の血漿中 NT-proBNP 濃度の平均を求め、運動前後の変動の有無を評価した。また、各採血日の血漿中 NT-proBNP 濃度の平均および SD より算出した CV で運動前後の血漿中 NT-proBNP 濃度の変動の程度を評価した。

血漿中 NT-proBNP 濃度の測定に用いるサンプルの処理は第 2 章にて決定した方法に従い、測定は IDEXX LABORATORIES 株式会社に依頼した。

血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動、週間変動、食事による影響、そして運動による影響は、反復測定分散分析により解析した。P < 0.05 を有意とした。全ての統計処理は市販の統計ソフト(Dr. SPSS II for Windows, Version 11.0, 1J, SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan)を用いて行った。結果は特に明記しない限り平均 ± SD で表記した。

### 3. 結果

#### (1) 実験 1

各供試動物の各採血時刻の血漿中 NT-proBNP 濃度、平均、SD および CV を表 2 に示した。

表 2. 各採血時刻の血漿中 NT-proBNP 濃度、そしてその平均、標準偏差 (SD)および変動係数 (CV)

		採血時刻							平均	SD	CV	
		10:30	13:30	16:30	19:30	22:30	1:30	4:30				7:30
イヌ	No. 1	300.9	247.5	244.0	257.8	197.2	207.4	191.5	183.4	228.7	40.6	17.7
	No. 2	300.5	278.0	312.0	335.2	264.2	366.8	259.9	226.6	292.9	45.0	15.4
	No. 3	142.2	238.3	172.5	136.9	142.3	132.9	151.3	123.1	154.9	36.7	23.7
	No. 4	386.9	405.1	344.9	402.4	378.7	415.7	320.3	322.4	372.1	37.9	10.2
	No. 5	282.6	321.7	351.6	377.2	373.3	321.7	299.7	343.8	333.9	33.7	10.1
	No. 6	618.0	598.3	666.9	706.3	523.7	633.0	573.3	665.0	623.1	58.2	9.3
	No. 7	418.0	462.0	483.5	451.6	352.4	375.9	338.6	295.9	397.2	66.7	16.8
ネコ	No. 1	24.7	41.9	53.3	37.3	47.6	29.5	24.0	38.8	37.1	10.6	28.5
	No. 2	44.7	75.6	36.3	34.2	28.9	42.7	48.1	37.3	43.5	14.4	33.0
	No. 3	67.8	94.4	57.4	71.4	64.0	62.6	52.3	43.4	64.2	15.1	23.5
	No. 4	24.0	35.9	40.3	63.2	30.3	24.7	24.0	30.7	34.1	13.1	38.5
	No. 5	34.8	33.1	25.4	31.3	74.0	48.9	85.5	28.6	45.2	22.6	50.0

(単位: 血漿中 NT-proBNP 濃度 [pmol/L]、CV: [%])

全てのイヌのデータから算出した血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動は  $14.7 \pm 5.2\%$  で、この変動に有意性はなかった。全てのネコのデータから算出した血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動は  $34.7 \pm 10.2\%$  で、イヌと同様、この変動に有意性はなかった。各供試動物の各採血日の血漿中 NT-proBNP 濃度、そしてその平均、SD および CV を表 3 に示した。

イヌおよびネコの週間変動の CV はそれぞれ  $19.4 \pm 6.5$  および  $28.1 \pm 10.7\%$  であった。これらの週間変動に有意性は認められなかった。

イヌの日内および週間変動の CV は、第 2 章で求めた測定内および測定間変動（それぞれ  $11.4$  および  $19.9\%$ ）と同程度であり、その中でも最大の CV は、測定間変動の  $19.9\%$  であった。ネコの日内および週間変動は、第 2 章で求めた測定内および測定間変動（それぞれ  $10.6$  および  $16.9\%$ ）より高値であり、この中で最大の CV は日内変動の  $34.7\%$  であった。

表 3. 各週の血漿中 NT-proBNP 濃度、そしてその平均、標準偏差 (SD)および変動係数 (CV)

		第 1 週目	第 2 週目	第 3 週目	平均	SD	CV
イヌ	No. 1	198.5	228.6	259.1	228.7	30.3	13.2
	No. 2	294.0	338.5	246.2	292.9	46.1	15.8
	No. 3	141.8	196.5	126.6	154.9	36.8	23.7
	No. 4	307.0	321.5	487.7	372.1	100.4	27.0
	No. 5	315.0	252.3	434.5	333.9	92.6	27.7
	No. 6	591.3	562.5	715.4	623.1	81.2	13.0
	No. 7	335.1	456.6	400.0	397.2	60.8	15.3
ネコ	No. 1	50.0	37.4	24.0	37.1	13.0	35.0
	No. 2	45.5	46.1	38.9	43.5	4.0	9.2
	No. 3	87.9	53.9	50.7	64.2	20.6	32.1
	No. 4	45.0	24.0	33.4	34.1	10.5	30.8
	No. 5	58.7	48.0	28.8	45.2	15.2	33.5

(単位: 血漿中 NT-proBNP 濃度 [pmol/L]、CV: [%])

実験1の全測定濃度のうち IDEXX LABORATORIES 株式会社が公表および推奨している心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値（イヌでは < 900 pmol/L、ネコでは < 100 pmol/L）を越えたサンプルは、イヌでは認められなかったが、ネコでは全 120 サンプル中 5 サンプル（4.2%）だった [47]。

## (2) 実験 2

規定量の食事を全て採食しなかった No.6 を除外し、No.1 - 5 および No.7 の 6 頭のデータを解析した。各供試動物の食事前後の血漿中 NT-proBNP 濃度、そしてその平均、SD および CV を表 3 に示した。食事前後の血漿中 NT-proBNP 濃度の CV は  $16.2 \pm 3.8\%$  で、有意性は認められなかった（図 1）。食事前後の CV は実験 1 で求めた週間変動の範囲内であった。

表 4. 各供試動物の食事前後の血漿中 NT-proBNP 濃度、平均、標準偏差 (SD)および変動係数 (CV)

	食事前	食後の経過時間 (分)						平均	SD	CV
		5	15	30	60	120	180			
No. 1	845.4	779.8	774.3	735.6	593.8	692.8	743.8	737.9	79.0	10.7
No. 2	446.9	319.2	304.4	262.6	428.7	307.8	308.3	339.7	69.6	20.5
No. 3	260.2	218.3	202.8	287.6	253.8	238.2	208.4	238.5	30.8	12.9
No. 4	525.0	552.9	435.7	427.2	334.4	402.1	398.6	439.4	75.8	17.2
No. 5	353.3	289.2	318.1	223.2	231.9	298.4	297.5	287.4	46.0	16.0
No. 7	516.7	670.9	472.2	517.9	491.1	379.5	390.4	491.3	97.1	19.8

(単位: 血漿中 NT-proBNP 濃度 [pmol/L]、CV: [%])

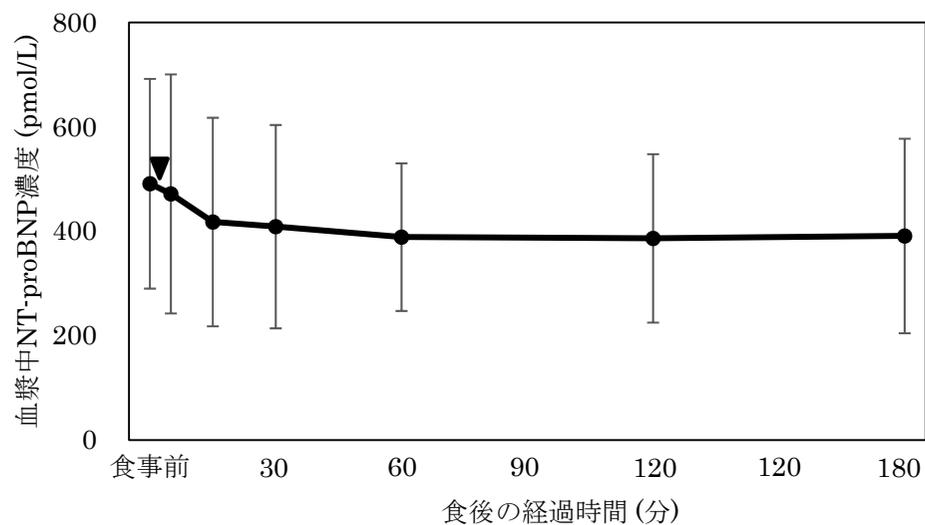


図. 1 全供試動物の血漿中 NT-proBNP 濃度の食事前後の変動。●は各時間の平均濃度、髭は標準偏差を示す。▼は食事の時間を示す。

実験 3 では、15 分間の運動を完了できなかった No.6 を除外し、No.1 - 5 および No.7 の 6 頭のデータを解析した。各供試動物の運動前後の血漿中 NT-proBNP 濃度、そしてその平均、SD および CV を表 4 に示した。運動前後の血漿中 NT-proBNP 濃度の CV は  $16.3 \pm 3.8$  % で、有意性は認められなかった (図 2)。運動前後の CV は実験 1 で求めた週間変動の範囲に収まる値であった。

表 5. 各供試動物の運動前後の血漿中 NT-proBNP 濃度、そしてその平均、標準偏差 (SD)および変動係数 (CV)

	運動前	運動後の経過時間 (分)						平均	SD	CV
		5	15	30	60	120	180			
No. 1	360.2	548.2	418.6	536.2	390.8	392.3	408.6	436.4	74.6	17.1
No. 2	285.3	411.2	367.1	348.4	270.7	458.3	442.6	369.1	73.3	19.9
No. 3	272.5	189.4	242.2	205.7	171.6	219.6	219.3	217.2	33.4	15.4
No. 4	327.4	517.8	430.2	439.0	430.9	512.0	362.0	431.3	70.3	16.3
No. 5	260.1	351.5	460.0	348.5	322.0	354.7	265.7	337.5	67.1	19.9
No. 7	365.9	474.0	428.3	371.8	390.0	400.0	381.0	401.6	38.1	9.5

(単位: 血漿中 NT-proBNP 濃度 [pmol/L]、CV: [%])

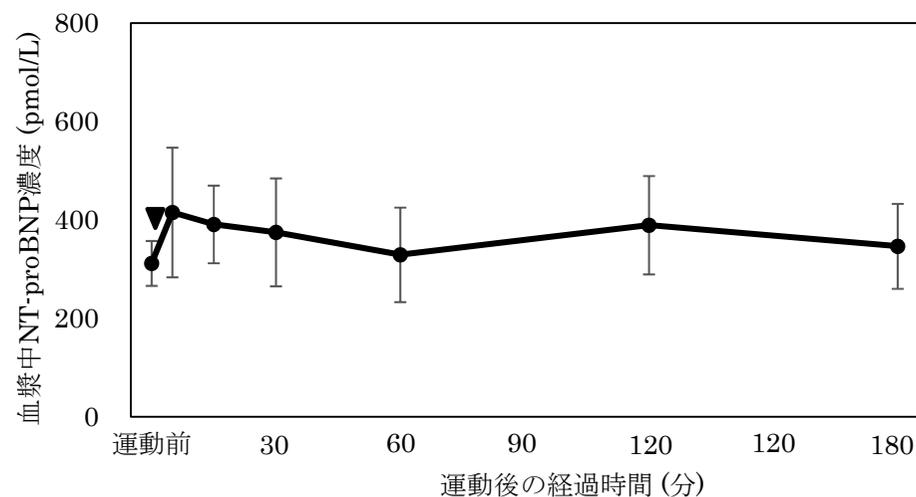


図. 2 全供試動物の血漿中 NT-proBNP 濃度の運動前後の変動。●は各時間の平均濃度、ヒゲは標準偏差を示す。▼は運動の時間を示す。

#### 4. 考察

本章の検討は、臨床的に健康なイヌおよびネコでは、血漿中 NT-proBNP 濃度には有意性はないものの、イヌで平均 14.7 %、そしてネコで平均 34.7 % の日内変動があることを明らかにした。この日内変動の程度は、健康なヒトで報告されているそれ (9.1 - 33.3%) と近似していた [68, 123]。本章の検討では、IDEXX LABORATORIES 株式会社が公表および推奨している心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値 (900 pmol/L) を超えたイヌはなかった。つまり、この日内変動を考慮してもイヌのこのカットオフ値は適切だと考えられた。これに対して、ネコでは、実験 1 に用いた全 120 サンプルのうち 5 サンプル (4.2 %) が IDEXX LABORATORIES 株式会社が公表および推奨している心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値 (< 100 pmol/L) を超えていた。このことから、ネコの血漿中 NT-proBNP 濃度を評価する際には、偽陽性の可能性を考慮する必要があると考えられる。

臨床的に健康なイヌおよびネコでは、統計学的な有意性はなかったが、大幅な週間変動の存在が明らかとなった。健康または心不全のヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度の週間変動は、33 - 35 % と報告されている [16, 123, 124]。健康なイヌを用いた別の研究では、本検討と同様、有意な週間変動は認められないものの、大幅な個体内変動が確認されている [52]。本章での、週間変動 (イヌで平均 19.4 %、ネコで平均 28.1 %) は、ヒトと比べてわずかではあるが低い値であったが、その値は高く偽陽性または偽陰性の結果を招く原因となりうると考えられた。ヒトでは血漿中 NT-proBNP 濃度の高い週間変動について、心臓以外の要因として水分摂取量、心拍数、腎機能および血圧が挙げられているが [5, 90, 116, 120]、本章の検討では評価していないため変動に影響した原因を明らかにできなかった。

日内変動および週間変動の程度、つまり CV はいずれもイヌよりもネコの方が高かった。これはネコの血漿中 NT-proBNP 濃度がイヌと比べて低いため、濃度としてはわずかな変動であっても CV に大きく影響したためであると考えられる。また、ネコは採血時にイヌよりも興奮する傾向が強く、採血に伴う一過性の血圧上昇が原因した可能性もあると推測された。

本章の検討は、食事および運動が血漿中 NT-proBNP 濃度に有意に影響し

ないことも明らかにした。健康犬では食物摂取後に一過性に心拍数、収縮期血圧および拡張期血圧が有意に上昇する [79]。本章の実験でも同様に血圧が上昇したと考えられるが、血漿中 NT-proBNP 濃度は変動しなかった。別の研究は、麻酔下で健康犬に容量負荷（リンゲル液を 90 - 100 ml/kg/h の速度で静脈内輸液を 60 分間継続）を加えると、心拍数、拡張末期左室圧および平均左室圧が有意に上昇するが、血漿中 NT-proBNP 濃度は心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値を超えなかったと報告している [43]。本章の実験 2 および 3 で生じた心負荷はこの報告ほどではないと予想される。すなわち、食事または運動により心負荷は増大したと思われるが、血漿中 NT-proBNP 濃度を上昇させるほどではなかったと判断した。

本章で求めたイヌの日内および週間変動、そして食事および運動による影響は、いずれも第 2 章で求めた測定変動の CV より低値であった。そのため、本章で確認された変動は測定変動である可能性もあり、血漿中 NT-proBNP 濃度を評価する際には、測定変動を考慮する必要がある。また、本章で求めたネコの日内および週間変動は、第 2 章で求めた測定変動より高値であったため、ネコでは日内および週間変動を考慮する必要があると考えられた。

以上より、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度を測定する場合に、その採血時刻に制限はないと考えられる。しかし、測定変動、日内変動および週間変動を考慮すると、その CV としてイヌでは約 20 %、そしてネコでは約 35 % の変動が確認されたため、特にネコでは偽陽性および偽陰性となる可能性が高いと考えられる。また、採血前の食事、そして散歩程度の運動であれば血漿中 NT-proBNP 濃度は有意に変動せず、確認された変動も日内変動または週間変動の範囲内に収まるため、特に考慮する必要がないと考えられる。したがって、同一個体で血漿中 NT-proBNP 濃度を連続的に測定する場合は、その変動が上記の幅を越えて変動した場合に臨床的に意義のある変化として捉える必要がある。

本章には 3 つの制限がある。第 1 に、臨床現場では採血は常に明るい環境で行われることを想定して、本検討は常に明期の状態で実施された。そのため厳密な意味での日内変動とは異なる可能性がある。第 2 に、実験 3 での運動時間はわずか 15 分間であったため、更に強い運動を負荷した場合に血漿中

NT-proBNP 濃度が変動するか否かは不明だった。最後に、本検討では健康犬のみが使用されたが、心不全犬では食事および運動に関連した心負荷の変化程度が健康犬と異なる可能性がある。

## 5. 小括

本章では、臨床的に健康なイヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動および週間変動の有無を調査した。また臨床的に健康なイヌを用いて、食事および運動が血漿中 NT-proBNP 濃度に及ぼす影響を評価した。

その結果、臨床的に正常なイヌおよびネコでは一定の日内変動は認められないこと、そして食事および運動は血漿中 NT-proBNP 濃度に影響しないことが明らかになった。しかし、有意ではないが、イヌで約 20 %、そしてネコでは約 35 %もの日内変動または週間変動が存在したことから、同一個体で連続的に測定した血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈する場合、臨床的に意義のない生理的な変動としてこの程度の変化を認識する必要があると考えられた。特にネコでは、正常であっても一定の確率で偽陽性を示す可能性があるため、単回の測定による血漿中 NT-proBNP 濃度の評価は注意が必要であると考えられた。

## 第 4 章

血漿中 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度  
に対する糸球体ろ過量の影響の評価

## 1. 緒言

B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)と異なり、N末端 proB型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)の排泄は腎臓に依存している [39, 112]。そのため、糸球体ろ過量 (GFR)が低下したヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は血漿 BNP 濃度よりも顕著に上昇する [1, 15, 26, 60, 65-67, 92, 114, 1189]。そこで、ヒトでは血漿中 NT-proBNP 濃度を心臓バイオマーカーとして用いる際には、GFR に応じたカットオフ値が設定されている [1, 4, 54]。

イヌおよびネコでも血漿中 NT-proBNP 濃度が高窒素血症に伴って上昇することは既に報告されている [58, 89, 96]。しかし、血中尿素窒素 (BUN)およびクレアチニン (Cre)濃度は腎機能だけでなく、水和状態、食事、体重などの腎外要因の影響も受ける [24, 30]。そのため、血漿中 NT-proBNP 濃度と BUN および Cre は相関するという報告と [13, 82, 96]、相関しないという報告があり [89]、混乱を招いている。この原因の 1 つとして、血漿中 NT-proBNP 濃度と GFR の関連を評価した研究が動物では実施されていないことが挙げられる。そこで本章では、GFR を測定したイヌおよびネコで GFR と血漿中 NT-proBNP 濃度の関連を評価した。なお、本章の内容の一部は既に *Veterinary Journal* に公表済みである [72]。

## 2. 材料及び方法

2008年2月から2011年4月の間に本学附属動物医療センター腎臓科および一般開業動物病院 1 施設にて、血漿イオヘキソールクリアランス試験 (PCio) により GFR を測定したイヌ 73 頭 (未去勢雄 14 頭、去勢雄 17 頭、未避妊雌 18 頭および避妊雌 24 頭)、そしてネコ 34 頭 (未去勢雄 6 頭、去勢雄 7 頭、未避妊雌 5 頭および避妊雌 16 頭)を用いた。イヌおよびネコの年齢の中央値 [最小 - 最大])はそれぞれ 8.3 (0.7 - 16.0)および 8.6 (2.3 - 13.8)歳であった。聴診により心雑音がないことが全ての供試動物で確認された。

血液は頸静脈、橈側皮静脈または大腿静脈のいずれかから採取した。採取した血液は 2 分し、半量にはヘパリンを添加し、BUN および Cre の測定に用いた。残りの半量の血液は、血漿中 NT-proBNP 濃度の測定に用いるために 2 章で定めた方法に従って処理し、IDEXX LABORATORIES 株式会社に測定を依

頼した。

イオヘキソールは、市販されている非イオン系のヨード系造影剤であるが、イヌおよびネコの GFR の測定にも用いられている [33, 71, 73]。

最初に採血した後、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、これ以下の場合 90 mgI/kg とした。投与完了時点を 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 [71]。

血漿 50 $\mu$ l をスクリー・キャップ付き 10ml 試験管にマイクロピペットで分注した。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 5ml 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を 100 $\mu$ l ずつ Working solution 1ml に分注し、十分に攪拌した後、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 分間静置した。その後、410nm 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 [71]。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における傾き ( $-\beta$ ) および切片 (B) から求められる。

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

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

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した。

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

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

Cl は体表面積 (BSA)により標準化した。BSA は以下の一般的な式 [71]を用いて体重 (BW [kg])から算出した。

$$\text{BSA [m}^2\text{]} = (\text{K} \times \text{BW}^\alpha) / 10^4$$

ここで K は形態係数で、イヌでは 10.0 である。α は質量係数で、イヌおよびネコでそれぞれ 0.71 および 0.66 である [71]。

イヌでは PCio の測定値が 10 ml/min/m<sup>2</sup> 未満だった症例を重度 GFR 低下群、10 - 20 ml/min/m<sup>2</sup> だった症例を中程度 GFR 低下群、20 - 40 ml/min/m<sup>2</sup> だった症例を軽度 GFR 低下群、そして 40 ml/min/m<sup>2</sup> を越えていた症例を正常群とした。ネコでは、10 ml/min/m<sup>2</sup> 未満だった症例を重度 GFR 低下群、10 - 20 ml/min/m<sup>2</sup> だった症例を中程度 GFR 低下群、20 - 35 ml/min/m<sup>2</sup> だった症例を軽度 GFR 低下群、そして 35 ml/min/m<sup>2</sup> を越えていた症例を正常群とした。

血圧の測定は、動物用非観血的血圧測定器 (BP100D、フクダエムイー株式会社)を用いたオシロメトリック法により、麻酔および鎮静処置を施さずに収縮期血圧 (SBP)を測定した。カフは尾根部に設置し、心拍数が安定した時点での血圧を採用した。SBP が 160mmHg を越えていたイヌおよびネコを高血圧と判断した。

血漿中 NT-proBNP 濃度および各観察項目の正規性の評価には Shapiro-Wilk 検定を用いた。評価項目の相関は Spearman の順位相関係数により評価した。また、血漿中 NT-proBNP 濃度を従属変数としてステップワイズ法を用いた重回帰分析を実施し、血漿中 NT-proBNP 濃度を決定する要因を検索した。多群間の比較には Bonferroni 法を用いた Mann-Whitney の U 検定を用いた。P < 0.05 を有意と判断した。全ての統計処理は統計ソフト (Dr.SPSS II for Windows, Version 11.0, 1J, SPSS, Inc., Tokyo, Japan)を用いて行った。

### 3. 結果

ネコでは、重度 GFR 低下群および中程度 GFR 低下群の症例数がそれぞれ 1 例および 2 例と少数であったため、これら 3 例を中程度-重度 GFR 低下群として一括して解析した。イヌおよびネコの各群の症例数、PCio 値、血漿中 NT-proBNP 濃度、BUN 濃度、Cre 濃度および SBP を表 1 および 2 に示した。

表 1. 各群のイヌの症例数、PCio 値、血漿中 NT-proBNP 濃度、BUN、Cre および SBP

	正常群	軽度 GFR 低下群	中程度 GFR 低下群	重度 GFR 低下群
症例数	11	29	30	3
PCio*値 (ml/min/m <sup>2</sup> )	44.1 (40.9 - 62.9) <sup>†</sup>	30.1 (20.3 - 37.2) <sup>†</sup>	16.3 (10.2 - 19.9) <sup>†</sup>	7.5 (7.2 - 10.0) <sup>†</sup>
血漿中 NT-proBNP 濃度 (pmol/L)	317.0 (50.0 - 872.7) <sup>†</sup>	467.7 (98.0 - 3795.0) <sup>‡</sup>	966.0 (108.7 - 2765.8) <sup>†,‡</sup>	887.8 (387.6 - 2123.7)
BUN (mg/dL)	12.9 (8.6 - 21.9) <sup>†,‡</sup>	19.2 (7.0 - 129.9)	32.2 (13.9 - 71.0) <sup>†</sup>	59.2 (30.1 - 94.1) <sup>‡</sup>
Cre (mg/dL)	1.1 (0.7 - 1.9) <sup>†</sup>	0.8 (0.3 - 1.8) <sup>‡,§</sup>	1.6 (0.8 - 2.5) <sup>†,‡</sup>	2.5 (1.3 - 2.7) <sup>§</sup>
SBP (mmHg)	150 (146 - 159)	134 (103 - 176)	141 (103 - 181)	130 (108 - 145)

†、‡および§: 同一記号の間に有意差あり (P < 0.05)

\*PCio: 血漿イオヘキソールクリアランス

表 2. 各群のネコの症例数、Pcio 値、血漿中 NT-proBNP 濃度、BUN、Cre および SBP

	正常群	軽度 GFR 低下群	中程度-重度 GFR 低下群
症例数	12	19	3
PCio*値 (ml/min/m <sup>2</sup> )	40.3 (37.1 - 95.9) <sup>†</sup>	29.0 (21.0 - 34.5) <sup>†</sup>	14.3 (9.5 - 14.4) <sup>†</sup>
血漿中 NT-proBNP 濃度 (pmol/L)	67.4 (24.0 - 203.6)	24.0 (24.0 - 290.0) <sup>†</sup>	323.0 (133.1 - 796.0) <sup>†</sup>
BUN (mg/dL)	19.6 (13.3 - 31.1) <sup>†</sup>	23.4 (15.8 - 57.6) <sup>‡</sup>	45.8 (37.5 - 48.3) <sup>†,‡</sup>
Cre (mg/dL)	1.3 (0.8 - 1.7) <sup>†</sup>	1.5 (1.2 - 2.3) <sup>‡</sup>	2.7 (1.9 - 3.4) <sup>†,‡</sup>
SBP (mmHg)	132 (125 - 147)	135 (125 - 156)	178 (161 - 194)

†および‡: 同一記号の間に有意差有り (P < 0.05)

\*PCio: 血漿イオヘキソールクリアランス

IDEXX LABORATORIES 株式会社公表および推奨している、心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値（イヌ：< 900 pmol/L、ネコ：< 100 pmol/L）[47]を超えていた症例は、イヌの正常群では 0 / 11 頭（0 %）、軽度 GFR 低下群では 2 / 29 頭（6.9 %）、中程度 GFR 低下群では 17 / 30 頭（56.7 %）、そして重度 GFR 低下群では 1 / 3 頭（33.3 %）であった。ネコの正常群では 3 / 12（25.0 %）、軽度 GFR 低下群では 3 / 19（15.8 %）、そして中程度-重度 GFR 低下群では 3 / 3（100 %）であった。

イヌでは、正常群、軽度 GFR 低下群、中程度 GFR 低下群および重度 GFR 低下群の血漿中 NT-proBNP 濃度は、それぞれ 317.0（50.0 - 872.7）、467.7（98.0 - 3795.0）、966.0（108.7 - 2765.8）および 887.8（387.6 - 2123.7）pmol/L であった。中程度 GFR 低下群の血漿中 NT-proBNP 濃度は、正常群および軽度 GFR 低下群のそれと比べて有意に高値を示した（いずれも  $P < 0.05$ ）。他の群間では有意差は検出されなかった。ネコでは、正常群、軽度 GFR 低下群および中程度-重度 GFR 低下群の血漿中 NT-proBNP 濃度は、それぞれ 67.4（24.0 - 203.6）、24.0（24.0 - 290.0）および 323.0（133.1 - 796.0）であった。中程度-重度 GFR 低下群の血漿中 NT-proBNP 濃度は、軽度 GFR 低下群のそれと比べて有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）。他の群間には有意差は検出されなかった（図 1）。

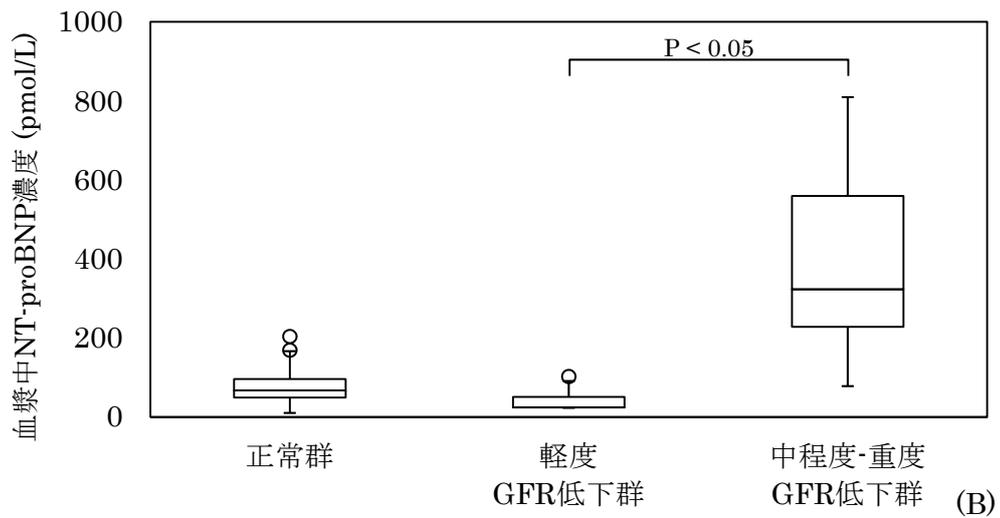
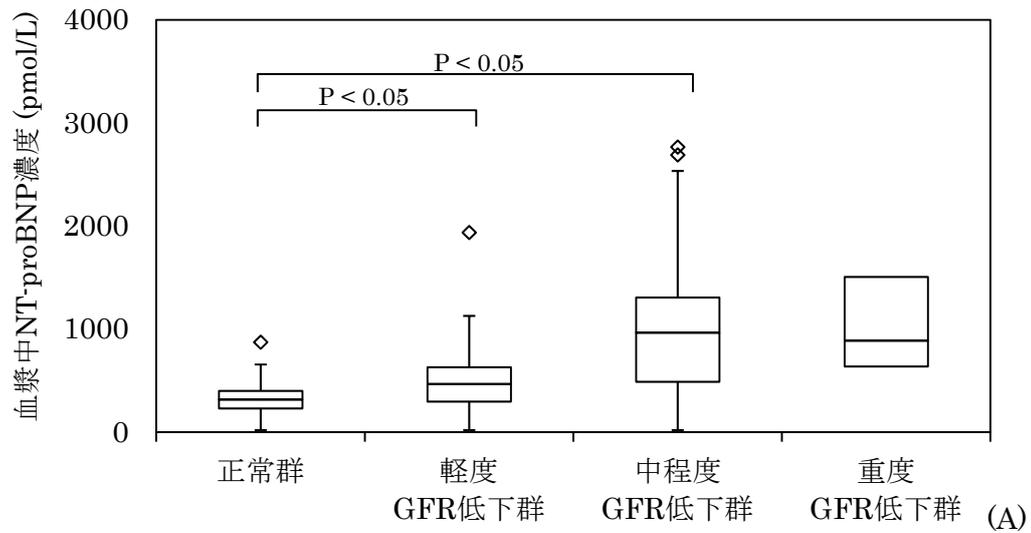


図 1. イヌ (A)およびネコ (B)の各群の血漿中 NT-proBNP 濃度の箱髴図。箱の中のラインは各群の中央値、箱の下端は第 1 四分位点、箱の上端は第 3 四分位点をそれぞれ示す。髴の下端および上端はそれぞれ、四分位範囲の 1.5 倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。○は外れ値を示す。

イヌの血漿中 NT-proBNP 濃度は PCio、BUN および Cre と有意に相関したが、SBP との間に有意な相関は検出されなかった (図 2-5)。

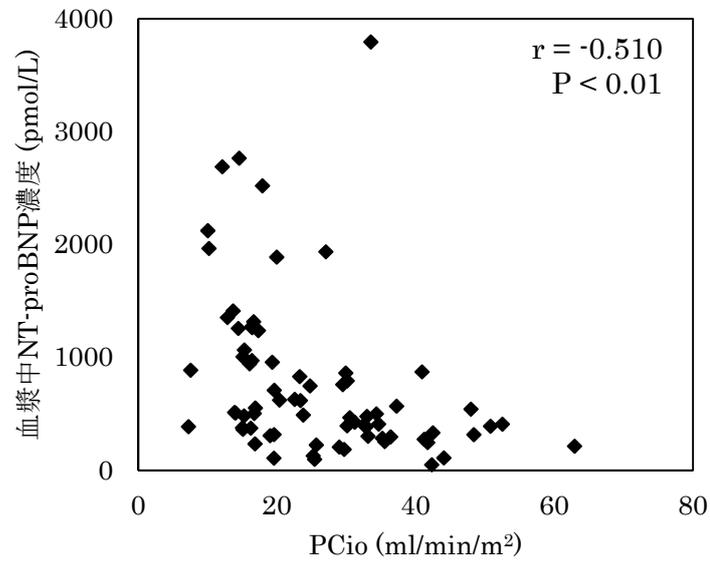


図 2. 血漿中 NT-proBNP 濃度と PCio の相関図

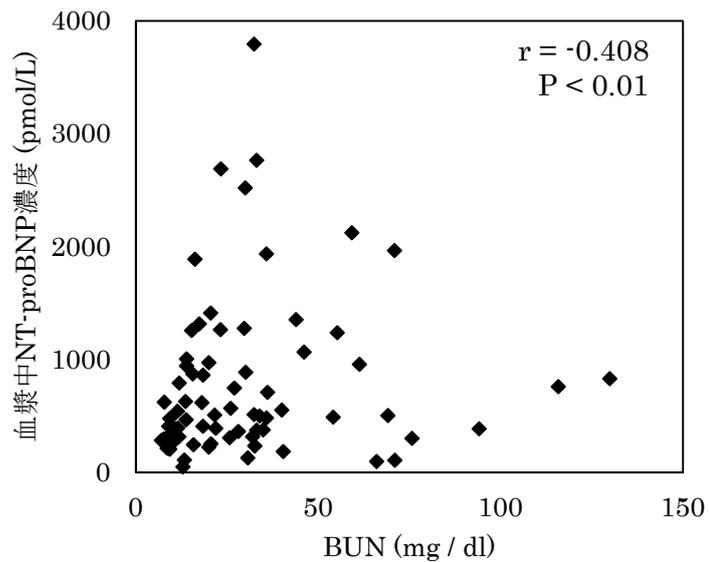


図 3. 血漿中 NT-proBNP 濃度と BUN の相関図

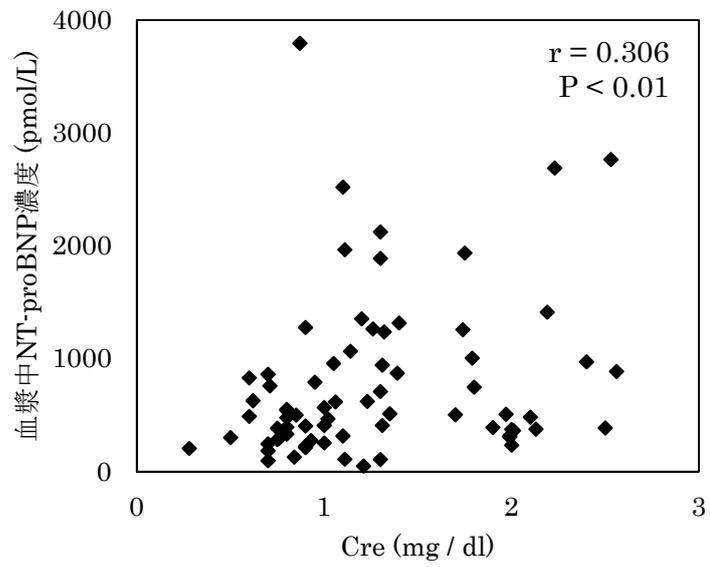


図 4. 血漿中 NT-proBNP 濃度と Cre の相関図

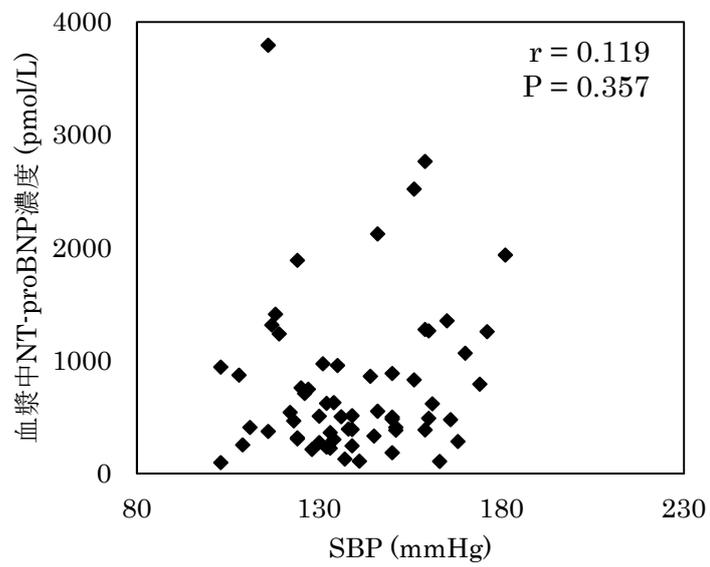


図 5. 血漿中 NT-proBNP 濃度と SBP の相関図

ネコでは血漿中 NT-proBNP 濃度は BUN および Cre と有意に相関したが、PCio および収縮期血圧との間に有意な相関は検出されなかった (図 6 - 9)。

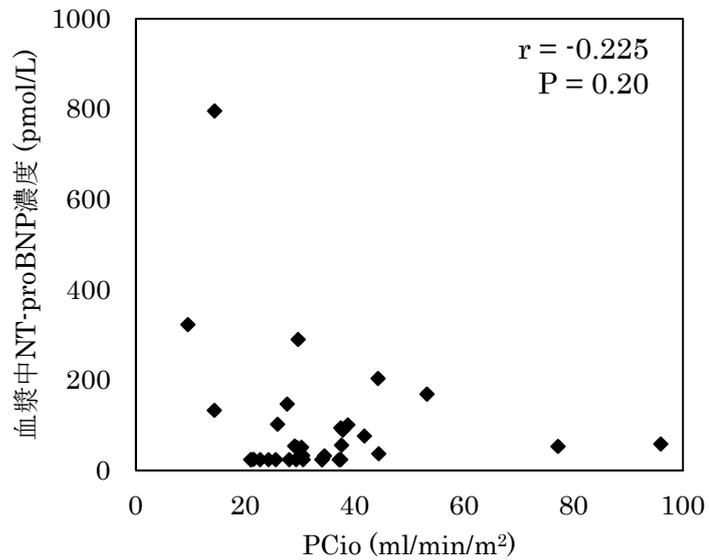


図 6. 血漿中 NT-proBNP 濃度と PCio の相関図

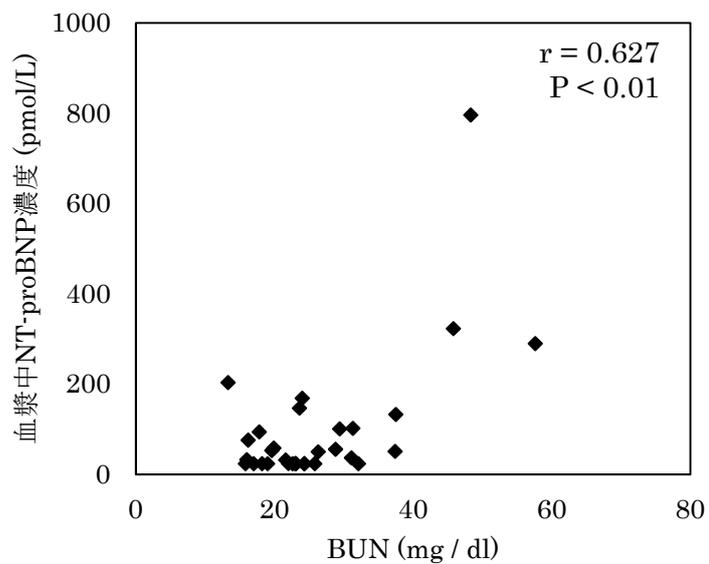


図 7. 血漿中 NT-proBNP 濃度と BUN の相関図

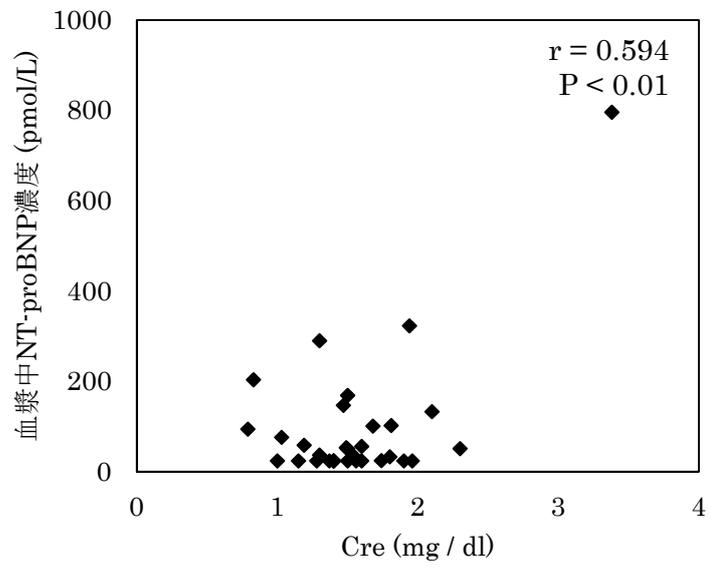


図 8. 血漿中 NT-proBNP 濃度と Cre の相関図

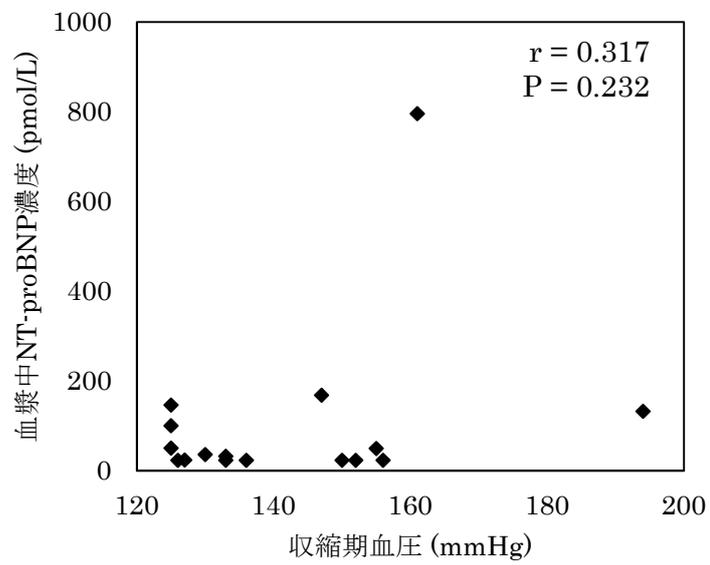


図 9. 血漿中 NT-proBNP 濃度と SBP の相関図

重回帰分析より、イヌでは血漿中 NT-proBNP 濃度を従属因子とした場合の決定要因として PCio ( $P < 0.05$ )が選択され、ネコでは Cre ( $P < 0.01$ )が選択された。

各群のイヌを高血圧の有無にしたがって細分類し、各群の血漿中 NT-proBNP 濃度を比較した (表 3)。症例数が不十分であったため、血漿中 NT-proBNP 濃度に有意差の認められなかった、中程度 GFR 低下群および重度 GFR 低下群を一括して中程度-重度 GFR 低下群として解析した。ネコでは軽度 GFR 低下群に高血圧の症例が認められず、中程度-重度 GFR 低下群では正常血圧の症例が認められなかったため、血圧による細分類はできなかった。

表 3. イヌの GFR 低下群を高血圧の有無で細分類した際の血漿中 NT-proBNP 濃度および SBP

	軽度 GFR 低下		中程度-重度 GFR 低下	
	正常血圧群	高血圧群	正常血圧群	高血圧群
症例数	18	6	24	5
血漿中 NT-proBNP 濃度 (pmol/L)	438.7 (98.0 - 3795.0)	555.0 (285.0 - 1937.0)	798.9 (235.1 - 2765.8)	1258.0 (108.7 - 1354.3)
SBP (mmHg)	134 (103 - 156) <sup>†</sup>	167 (160 - 181) <sup>†</sup>	132 (103 - 159) <sup>‡</sup>	165 (160 - 176) <sup>‡</sup>

† および ‡: 同一記号間に有意差あり (P < 0.05)

軽度 GFR 低下群のイヌの血漿中 NT-proBNP 濃度は、正常血圧群および高血圧群で、それぞれ 438.7 (98.0 - 3795.0) および 555.0 (285.0 - 1937.0) pmol/L であり、2 群間に有意差は検出されなかった ( $P = 0.378$ )。中程度-重度 GFR 低下群の正常血圧群および高血圧群では、それぞれ 798.9 (235.1 - 2765.8) および 1258.0 (108.7 - 1354.3) pmol/L であり、2 群間に有意差は検出されなかった ( $P = 0.634$ ) (図 10)。

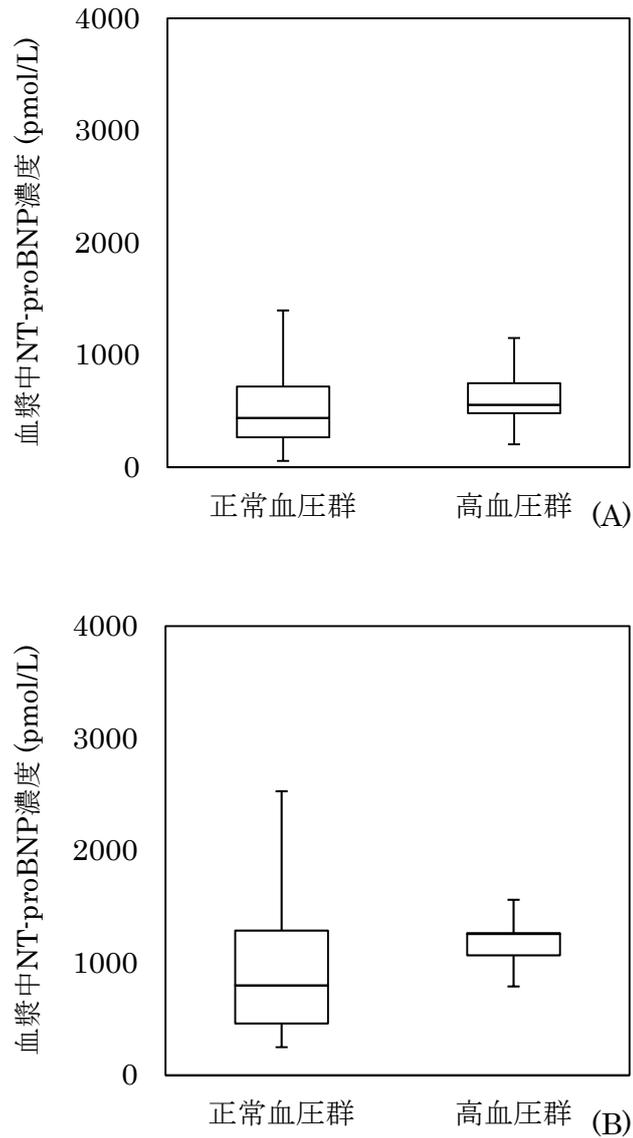


図 10. 高血圧の有無で細分類した際の、イヌの軽度 GFR 低下群 (A)および中程度-重度 GFR 低下群 (B)の血漿中 NT-proBNP 濃度の箱髭図。箱の中のラインは各群の中央値、箱の下端は第 1 四分位点、箱の上端は第 3 四分位点をそれぞれ示す。髭の下端および上端はそれぞれ、四分位範囲の 1.5 倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。

#### 4. 考察

本章の検討により、イヌの血漿中 NT-proBNP 濃度は GFR と有意に相関すること、心疾患に罹患していない場合であっても IDEXX LABORATORIES 株式会社が公表している心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値を越える症例が存在することが明らかとなった。イヌでは、正常群では偽陽性を示した個体は認められなかったが、軽度 GFR 低下群では 6.9 %、中程度 GFR 低下群では 56.7 %、重度 GFR 低下群では 33.3 %のイヌが偽陽性を示した。これに対して、ネコでは血漿中 NT-proBNP 濃度は GFR とは有意に相関しなかった。しかし、軽度に GFR が低下したネコと比べて、中程度から重度に GFR が低下したネコでは、血漿中 NT-proBNP 濃度が有意に上昇した。さらに、IDEXX LABORATORIES 株式会社が公表している、心疾患の可能性が低いと判断するカットオフ値を越えた症例は多く確認され、正常群では 25.0 %、軽度 GFR 低下群では 15.8 %、中程度-重度 GFR 低下群では 100 %の症例が偽陽性を示した。このことから、ネコでは軽度の GFR の低下は血漿中 NT-proBNP 濃度に影響を与えない可能性があり、中程度から重度に GFR が低下するとその影響が大きくなると考えられる。すなわち、イヌおよびネコで血漿中 NT-proBNP 濃度を心臓バイオマーカーとして利用する場合には、GFR の影響を考慮する必要があると考えられる。

イヌおよびネコの両者の全群で、血漿中 NT-proBNP 濃度は広い範囲を示していた。このことは、IDEXX LABORATORIES 株式会社が公表しているカットオフ値に対して高い偽陽性率を示した原因の一つであると考えられる。ヒトでは、腎臓病に伴う血漿中 NT-proBNP 濃度の上昇機序として、NT-proBNP のクリアランス減少を伴う GFR の低下、腎不全に伴う血漿量の増加による心臓負荷、あるいは潜在的な心疾患の合併が報告されている [1, 72]。

本章の検討では、高血圧と血漿中 NT-proBNP 濃度の関連はイヌでは認められなかった。しかし、ネコおよびヒトでは腎不全に伴う高血圧症において血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇することが報告されている [56, 58]。本章の結果がこれらの報告と一致しなかった原因は、本検討での高血圧群が軽度 GFR 低下群では 6 頭、中程度-重度 GFR 低下群では 5 頭とサンプルサイズが少なかったことに起因する可能性がある。また、動物を十分に安静にさせて適切に血圧を測定できなかった、つまり白衣高血圧の可能性も否定できない [64]。心臓に負

荷がかかって血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇するまでに約 40 分を要する [43]。そのため、一般的に言われている白衣高血圧症のような一過性の高血圧であった場合、血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇する前に採血が終了していると、高血圧の影響がこの濃度に反映されない可能性もある。本章の検討は、高血圧の影響を検討するためにデザインされていないため、高血圧による純粋な変動を評価するには、新たなプロトコルに基づいて症例を集めて再検討する必要があると考えられる。

イヌの心疾患の多くは聴診により検出可能であるため、心疾患のイヌは適切に除外できたと考えられる。しかし、ネコで多発する肥大型心筋症は聴診のみでは検出が困難な場合があり、この疾患でも血漿中 NT-proBNP 濃度は上昇する [22]。本章の検討では心エコー図検査を実施していないため、肥大型心筋症に罹患したネコを含んでいた可能性がある。このため、GFR の低下が同程度であるにも関わらず、血漿中 NT-proBNP 濃度は広い範囲を示したかもしれない。

## 5. 小括

本章では、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度に対する GFR の影響を評価した結果、イヌでは血漿中 NT-proBNP 濃度は GFR の低下と関連して上昇することが明らかとなった。ネコでは、GFR と相関はしないものの、中程度から重度に GFR が低下した際に血漿中 NT-proBNP 濃度が有意に上昇することが明らかとなった。すなわち、GFR の低下に伴った血漿中 NT-proBNP 濃度は、心疾患の可能性が低いと判断するためのカットオフ値を越えた動物に多いことが明らかになった。したがって、血漿中 NT-proBNP 濃度を心臓バイオマーカーとして利用する場合には、症例の GFR にも留意する必要があることが明らかになった。しかし、全ての症例で PCio などには GFR の測定は非現実的かつ困難であるため、GFR のマーカーとして一般的に用いられている Cre を併せて測定し、血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈するべきであると考えられた。

本章の結果を受けて、以降の章では GFR の影響を除外するために Cre 濃度が参考範囲内であることを新たに組み込み基準に含めることとした。

## 第5章

僧帽弁閉鎖不全症に罹患したイヌにおける血漿中

N末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の

診断的意義の検討

## 1. 緒言

僧帽弁の粘液腫様変性による僧帽弁閉鎖不全症 (MVI)は、最も一般的に認められるイヌの心疾患の一つである。北米の報告では、イヌの後天性心疾患の75%にMVIが認められたとしている [11]。MVIは、大型品種と比較して小型品種でより多く認められるため、小型品種が多く飼育されている我が国では、北米の報告より高い割合で発生していることが予想される。MVIの罹患率は雌と比べて雄の方が1.9倍高く、雄の方がより若齢から発生するが [98]、生命予後には性差はない [12, 38, 57]。粘液腫様変性は主に弁尖の線維層の破壊、海綿層における疎性結合組織の増加、酸性ムコ多糖類の過剰な蓄積を特徴とし、通常、この病変は加齢とともに数年以上かけ徐々に進行する [40]。この変性が重度になると、僧帽弁弁尖の肥厚または腱索断裂により、弁どうしの接合が不完全となりMVIが発生する。MVIにより左房および左室への容量負荷が上昇し、やがてうっ血性心不全 (CHF)に発展する [81]。さらに、進行すると肺高血圧症 (PH)が続発することもある [20, 81, 99, 102]。

PHは肺動脈圧の上昇と定義されており、その原因により前毛細血管性肺高血圧症および後毛細血管性肺高血圧症に分類される [17, 81]。ヒトでは、原因となる疾患が存在しない特発性PHが一般的であるが [7]、イヌでは心疾患、特にMVIに続発する後毛細血管性肺高血圧症が一般的である [20, 102]。PHに罹患すると腹水や肝腫大などを特徴とする右心不全徴候を引き起こす [49, 81]。さらに過去の研究では、心臓弁膜症の症例の約30%が僧帽弁および三尖弁の両者に粘液腫様変性が生じていること、MVIに罹患したイヌの約14%でPHが続発していたと報告されている [49, 99]。

通常、イヌの心疾患の臨床検査として身体検査、血液検査、血圧測定、心電図検査、胸部X線検査および心エコー図検査が主に実施されており、これらの検査結果に基づいて、重症度分類が実施され、また治療方針が決定されている。また、イヌでは、International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC)による心不全分類が一般的に用いられている [48] (表 1)。

表 1. International small animal cardiac health council による心不全の分類

ステージ I	検出可能な心疾患はあるが無徴候
Ia	容量負荷または圧負荷に伴う代償所見なし
Ib	容量負荷または圧負荷に伴う代償所見が胸部X検査または心エコー図検査で確認できる
ステージ II	軽度から中程度の心不全 安静時または軽い運動によって心不全徴候が発現する 患者の QOL が障害されている
ステージ III	進行した心不全 心不全の臨床徴候がすぐに明らかになる
IIIa	自宅療法が可能
IIIb	入院が強く勧められる

イヌの PH は、心エコー図検査、具体的には連続波ドプラ法およびパルスドプラ法を用いて算出した推定肺動脈圧 (ePAP)により診断されている [49, 53, 81, 102]。収縮期 ePAP は三尖弁逆流血流速 (TRV)から、拡張期 ePAP は肺動脈弁逆流血流速 (PRV)から算出される。小動物で広く受け入れられている PH の診断基準は、TRV > 3.0 m/sec および/または PRV > 2.5 m/sec である [81, 99, 102]。しかし、これらの流速の測定には、ドプラ法に対応した超音波診断装置に加えて、熟練した心エコー図検査技術が不可欠であることから、全ての施設で実施可能であるとは言い難いのが現実である。

ヒトでは血漿 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)濃度は、うっ血性心不全の可能性の除外または診断の補助 [8, 106]、無徴候の左室機能不全の患者のスクリーニング [42]、心不全の発生および死亡リスクの階級化 [105]、そして治療方針を策定する際の補助的情報 [31, 50]を目的に測定されている。また、ヒトでは、右室機能の低下に伴って血漿 B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)濃度が上昇すること、そして原発性 PH では血漿 BNP 濃度および NT-proBNP 濃度の両者が上昇する [59, 78, 97]。イヌでは、MVI のみに罹患した症例、そして PH を合併した症例で血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇することが報告されている [3, 82, 104]。しかし、血漿中 NT-proBNP 濃度に及ぼす三尖弁閉鎖不全症 (TVI)の合併の影響、さらにはこの濃度により PH の合併を

検出できるか否かは検討されていない。

そこで本章では、MVIに罹患したイヌでの血漿中 NT-proBNP 濃度の臨床的意義を2つに分けて検討した。すなわち、検討1では、MVIのみに罹患したイヌでの血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を評価した。そして検討2では、MVIにTVIを併発したイヌを対象に、PHを合併した場合の血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を評価した。

## 2. 材料および方法

研究デザインは回顧的研究とした。2006年8月から2013年1月の間に本学附属動物医療センター循環器科に来院し、各種検査によりMVIと診断されたイヌ(MVI群)、そして心臓が正常であることが確認されたイヌ(正常群)を検討1に組み込んだ。検討2では、検討1に組み込まれたイヌに加え、MVIおよびTVIを合併したイヌ(TVI群)を組み込んだ。さらにTVI群のイヌはPHの有無によりnonPH群およびPH群に細分類した。これらの動物の間診および身体検査の所見が全てカルテに記載されており、血液生化学検査、血圧測定、心電図検査、胸部X線検査および心エコー図検査、血漿中 NT-proBNP 濃度に関するデータが利用可能だったイヌを組み込んだ。血液生化学検査において、高窒素血症が確認されたイヌは除外された。

全てのイヌで年齢、体重、心拍数、血漿中 NT-proBNP 濃度、胸部X線写真側面像で測定した椎骨心臓スケール(VHS)および心エコー図検査変数(左房/大動脈根内径比[LA/AO]、僧帽弁逆流血流速[MRV]、推定左房圧[eLAP]、拡張末期心室中隔壁厚[IVSd]、拡張末期左室内径[LVIDd]および拡張末期左室後壁厚[LVPWd])を再評価した。体格の影響を除外するため、LVIDdは各症例の体重(BW)から求めた体表面積(BSA)で除することにより標準化し、LVIDd indexとした。BSAは以下の一般的な式[71]を用いて体重(kg)から算出した。

$$BSA [m^2] = (10.0 \times BW^{0.71}) / 10^4$$

eLAPは、簡易ベルヌーイの式を用いて、以下の式より算出した。

$$eLAP (mmHg) = \text{収縮期血圧} - 4 \times MRV^2$$

TVI群では、TRVおよび推定右房圧から求めたePAPも評価した。ePAPは簡易ベルヌーイの式を用いて、以下の式より算出した。

$$ePAP \text{ (mmHg)} = 4 \times TRV^2 + \text{推定右房圧}$$

推定右房圧は、右房拡大が認められない場合は 5 mmHg、右房拡大は認められるが頸静脈の怒張、肝腫大および腹水などの右心不全徴候が確認されない場合は 10 mmHg、そして右心不全徴候が認められる場合は 15 mmHg とした。

全ての心エコー図検査は、意識下にて 1 名の獣医師により、同一の機器 (Vivid7 dimension, GE Healthcare, Tokyo, Japan) で実施された。

血漿中 NT-proBNP 濃度の測定のためのサンプルの処理は、第 2 章にて決定した方法に従い、測定は IDEXX LABORATORIES 株式会社に依頼した。

結果は全て中央値 (最小値 - 最大値) で示した。正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定を用いた。各変数の群間の比較は、Mann-Whitney U 検定および Bonferroni 補正法を用いて行った。血漿中 NT-proBNP 濃度と心エコー図検査変数の相関性は、Spearman の順位相関係数により評価された。血漿中 NT-proBNP 濃度を従属因子とした重回帰分析を実施し、多重共線性の評価および血漿中 NT-proBNP 濃度の決定要因を評価した。多重共線性の判定は分散インフレ係数 (VIF) を用い、 $VIF \geq 10$  を多重共線性ありとした。受信者動作特性 (ROC) 曲線は、各重症度の MVI、TVI または PH を検出するための血漿中 NT-proBNP 濃度の感度、特異度およびカットオフ値の設定に用いた。 $P < 0.05$  を有意とした。全ての統計処理は市販の統計ソフト (Dr. SPSSII for Windows, Version 11.0, 1J, SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いて実施した。

### 3. 結果

検討 1 に組み込まれた正常群および MVI 群、そして検討 2 に組み込まれた MVI 群および TVI 群のイヌのプロフィールを表 2 に示した。品種は、正常群ではミニチュア・ダックスフンド (n = 8)、トイ・プードル (n = 2)、ゴールデン・レトリバー (n = 1)、柴犬 (n = 1)、スタンダード・プードル (n = 1)、チワワ (n = 1)、パピヨン (n = 1)、ポメラニアン (n = 1) およびマルチーズ (n = 1) であった。MVI 群のステージ Ia ではマルチーズ (n = 4)、雑種 (n = 4)、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 3)、シー・ズー (n = 3)、チワワ (n = 2)、トイ・プードル (n = 2)、ミニチュア・ダックスフンド (n = 1)、ヨークシャー・テリア (n = 1) およびラブラドル・レトリバー (n = 1) であり、ステージ Ib で

は、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 9)、雑種 (n = 9)、シー・ズー (n = 5)、マルチーズ (n = 5)、スピッツ (n = 3)、ポメラニアン (n = 3)、アメリカン・コッカー・スパニエル (n = 2)、ミニチュア・ダックスフンド (n = 2)、シェルティー (n = 1)、狆 (n = 1)、ビーグル (n = 1)、ミニチュア・シュナウザー (n = 1)およびヨークシャー・テリア (n = 1)であった。ステージ II ではマルチーズ (n = 21)、チワワ (n = 13)、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 8)、ポメラニアン (n = 6)、ヨークシャー・テリア (n = 4)、シー・ズー (n = 2)、トイ・プードル (n = 1)およびミニチュア・ダックスフンド (n = 1)であった。ステージ IIIa ではキャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 3)、チワワ (n = 3)、ポメラニアン (n = 1)およびマルチーズ (n = 1)であった。そして TVI 群のステージ Ia の nonPH 群ではマルチーズ (n = 3)、雑種 (n = 2)、シー・ズー (n = 2)、シェルティー (n = 1)およびミニチュア・ダックスフンド (n = 1)であり、PH 群はミニチュア・ダックスフンド (n = 1)であった。ステージ Ib の nonPH 群ではキャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 7)、雑種 (n = 2)、ミニチュア・シュナウザー (n = 2)、ゴールデン・レトリバー (n = 1)、シー・ズー (n = 1)、チワワ (n = 1)、ペキニーズ (n = 1)およびマルチーズ (n = 1)であり、PH 群はミニチュア・シュナウザー (n = 2)、ペキニーズ (n = 1)およびミニチュア・シュナウザー (n = 1)であった。ステージ II の nonPH 群ではキャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 11)、シー・ズー (n = 10)、マルチーズ (n = 8)およびチワワ (n = 1)であり、PH 群はマルチーズ (n = 18)、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 7)、シー・ズー (n = 4)、ペキニーズ (n = 1)、ミニチュア・シュナウザー (n = 1)およびヨークシャー・テリア (n = 1)であった。ステージ IIIa の nonPH ではミニチュア・ダックスフンド (n = 2)、ゴールデン・レトリバー (n = 1)、シー・ズー (n = 1)およびマルチーズ (n = 1)であり、PH 群はキャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (n = 7)、ミニチュア・ダックスフンド (n = 6)、マルチーズ (n = 5)、シー・ズー (n = 4)、ゴールデン・レトリバー (n = 2)、チワワ (n = 2)およびペキニーズ (n = 2)であった。また、血液サンプル採取時に投与されていた心不全治療薬を表 3 に示した。

表 2. 正常群、MVI 群および TVI 群の重症度別の症例数、年齢、体重、性別および心雑音の強度

	正常群	MVI 群 ISACHC ステージ				TVI 群 ISACHC ステージ			
		Ia	Ib	II	IIIa	Ia	Ib	II	IIIa
症例数	17	21	43	56	8	10 (1)	20 (4)	62 (32)	33 (28)
年齢 (歳)	4.3 (0.6 - 13.7)	9.1 (4.3 - 15.1)	10.5 (4.7 - 14.5)	11 (5.0 - 15.6)	11.1 (5.0 - 12.8)	12.6 (3.1 - 13.9)	11.3 (4.9 - 16.3)	12.2 (8.1 - 15.7)	10.0 (4.3 - 14.8)
体重 (kg)	4.6 (1.6 - 29.3)	4.7 (2.5 - 24.2)	5.5 (1.8 - 19.7)	3.3 (2.0 - 10.9)	3.0 (2.1 - 8.7)	5.5 (2.7 - 18.1)	6.5 (2.5 - 30.0)	4.5 (2.1 - 10.5)	5.7 (1.9 - 35.5)
性別									
雄	6	8	14	28	7	2 (0)	2 (0)	32 (22)	16 (14)
去勢雄	2	6	11	3	0	2 (1)	4 (0)	9 (2)	12 (9)
雌	5	4	7	11	1	3 (0)	2 (1)	0 (0)	2 (2)
避妊雌	4	3	11	14	0	3 (0)	12 (3)	21 (8)	3 (3)
Levine グレード (n)									
1/6	0	3	2	0	0	2 (1)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
2/6	0	8	11	1	0	3 (0)	3 (0)	1 (1)	1 (1)
3/6	0	4	14	7	0	3 (0)	7 (2)	3 (2)	9 (7)
4/6	0	5	7	7	1	1 (0)	3 (1)	10 (3)	1 (1)
5/6	0	0	8	15	2	0 (0)	3 (0)	5 (2)	6 (4)
6/6	0	1	1	26	5	1 (0)	2 (0)	43 (24)	16 (15)

\*TVI 群の症例数、性別および心雑音の項目におけるカッコ内の数字は肺高血圧症が確認された症例数を示す

表 3. MVI 群および TVI 群の血液サンプル採取時に投与されていた心不全治療薬

	MVI 群 ISACHC ステージ				TVI 群 ISACHC ステージ			
	Ia	Ib	II	IIIa	Ia	Ib	II	IIIa
症例数	21	43	56	8	10	20	62	25
ACEI	9	22	8	0	4	6	4	0
ACEI+フロセミド	0	0	0	0	0	0	0	1
ACEI+ISDN	1	5	4	0	0	3	2	1
ACEI+β-受容体遮断薬	0	2	1	0	0	0	0	0
ACEI+ジゴキシン+Spi	0	0	1	0	0	0	0	0
ACEI+フロセミド+PBD	0	0	0	0	0	0	0	1
ACEI+フロセミド+Spi	0	0	0	0	0	0	2	0
ACEI+ISDN+PBD	0	0	10	0	0	1	12	1
ACEI+ISDN+Spi	0	0	1	0	0	0	0	0
ACEI+ISDN+β-受容体遮断薬	0	1	1	0	0	0	4	1
ACEI+PBD+Spi	0	0	1	0	0	0	0	0
ACEI+Spi+トラセミド	0	0	0	0	0	0	0	1
ACEI+CCB+ジゴキシン+ISDN	0	0	1	0	0	0	0	0
ACEI+ジゴキシン+フロセミド+ISDN	0	0	2	0	0	0	5	3
ACEI+ジゴキシン+PBD+Spi	0	0	1	0	0	0	0	0
ACEI+フロセミド+ISDN+Spi	0	0	0	0	0	1	1	0
ACEI+フロセミド+ISDN+PBD	0	0	2	2	0	0	1	2
ACEI+フロセミド+ISDN+β-受容体遮断薬	0	0	1	0	0	0	4	0
ACEI+ISDN+PBD+Spi	0	0	1	0	0	0	2	0
ACEI+ISDN+Spi+TD	0	0	1	0	0	1	1	0
ACEI+ジゴキシン+フロセミド+ISDN+PBD	0	0	1	0	0	0	1	1
ACEI+ジゴキシン+フロセミド+ISDN+Spi	0	0	1	0	0	0	0	0
ACEI+ジゴキシン+ISDN+PBD+Spi	0	0	2	1	0	0	0	0
ACEI+フロセミド+ISDN+PBD+Spi	0	0	0	2	0	2	7	4
ACEI+フロセミド+ISDN+PBD+β-受容体遮断薬	0	0	2	1	0	0	0	0
ACEI+フロセミド+ISDN+Spi+β-受容体遮断薬	0	0	0	0	0	0	1	0
ACEI+ISDN+PBD+Spi+TD	0	0	7	1	0	1	11	1
ACEI+ISDN+Spi+TD+β-受容体遮断薬	0	0	0	0	0	0	0	1
ACEI+CCB+フロセミド+ISDN+PBD+Spi	0	0	1	0	0	0	0	2
ACEI+フロセミド+ISDN+PBD+Spi+TD	0	0	1	1	0	0	1	0
ACEI+フロセミド+PBD+Sil+Spi+TD	0	0	0	0	0	0	1	2
ACEI+ISDN+PBD+Sil+Spi+TD	0	0	0	0	0	0	1	0
投薬されていたイヌの割合 (%)	47.6	69.8	91.1	100	40.0	75.0	98.4	88.0

ACEI: アンギオテンシン変換酵素阻害薬、CCB: カルシウムチャネル拮抗薬、ISDN: 硝酸イソソルビド  
PBD: ピモベンダン、Sil: シルデナフィル、Spi: スピロラクトン、TD: サイアザイド系利尿薬

## 検討 1

血漿中 NT-proBNP 濃度は、正常群では 260.7 (58.7 - 655.6)、ISACHC ステージ Ia では 396.3 (103.1 - 2864.0)、ステージ Ib では 648.8 (137.4 - 6024.0)、ステージ II では 1114.0 (163.5 - 5102.0)、そしてステージ IIIa では 1551.5 (257.2 - 5419.5) pmol/L であった。ステージ Ib、II および IIIa の血漿中 NT-proBNP 濃度は、正常群のそれと比べて有意に高値を示した (全て  $P < 0.001$ )。また、ステージ II の血漿中 NT-proBNP 濃度は、ステージ Ia のそれと比べて有意に高値を示した ( $P < 0.001$ ) (図 1、表 4)。正常群および各ステージの MVI 群の VHS、LA/AO、LVIDd index、MRV、収縮期血圧および eLAP を表 4 に示した。

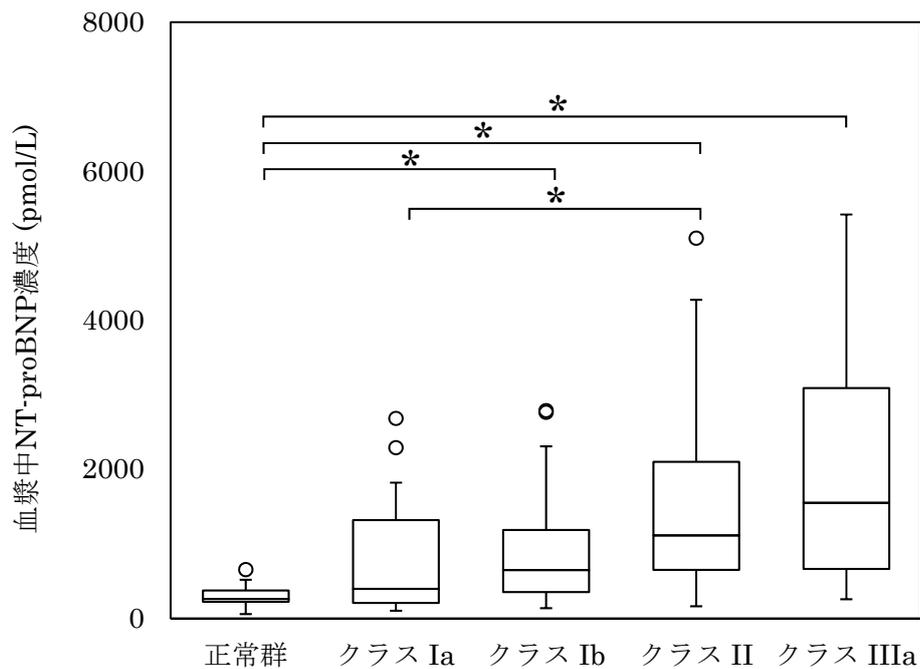


図 1. 正常群およびMVI群の重症度別の血漿中NT-proBNP濃度の箱髭図。箱の中央の線は中央値、箱の上端および下端はそれぞれ75%タイル値および25%タイル値、髭の下端および上端はそれぞれ、四分位範囲の1.5倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。○は外れ値を示す。\*:  $P < 0.001$ 。

表 4. 正常群および MVI 群の重症度別の各検査変数

	正常群	MVI 群 ISACHC ステージ			
		Ia	Ib	II	IIIa
血漿中 NT-proBNP 濃度 (pmol/L)	260.7 (58.7 - 655.6)	396.3 (103.1 - 2864.0)	648.8* (137.4 - 6024.0)	1114.0*† (163.5 - 5102.0)	1551.5* (257.2 - 5419.5)
VHS (v)	9.5 (8.8 - 10.1)	9.8 (8.5 - 10.2)	10.5*† (9.0 - 12.5)	11.4*†‡ (9.7 - 14.9)	12.8*†‡ (10.8 - 14.3)
LA / AO	1.37 (0.80 - 1.56)	1.37 (1.07 - 1.59)	1.79*† (0.91 - 4.00)	2.22*†‡ (1.22 - 4.36)	2.67*†‡ (1.84 - 5.36)
LVIDd index (mm / m <sup>2</sup> )	5.61 (2.39 - 7.80)	5.87 (3.33 - 7.63)	6.03 (3.51 - 10.44)	8.60*†‡ (4.11 - 11.26)	8.48*†‡ (6.86 - 11.77)
MRV (m / sec)	-	4.92 (1.50 - 6.53)	5.34 (2.53 - 6.81)	5.30 (3.42 - 7.75)	4.92 (3.54 - 6.73)
収縮期血圧 (mmHg)	142 (112 - 157)	143 (98 - 172)	137 (117 - 174)	128 (100 - 167)	121 (117 - 151)
eLAP (mmHg)	-	22 (3 - 59)	28 (0 - 135)	18 (0 - 85)	121 (117 - 151)

VHS: 椎骨心臓スケール、LA / AO: 左房 / 大動脈根内径比、LVIDd: 拡張末期左室内径、eLAP: 推定左房圧、MRV: 僧帽弁逆流血流速

\*: 正常群との間に有意差あり (P < 0.001)、†: ステージ Ia との間に有意差あり (P < 0.001)、‡: ステージ Ib との間に有意差あり (P < 0.001)

血漿中 NT-proBNP 濃度は、VHS、LA/AO および LVIDd index と有意に相関した (図 2-4)。しかし、MRV および eLAP の間には有意な相関は認められなかった。重回帰分析では、血漿中 NT-proBNP 濃度を決定する決定要因として LA/AO ( $P < 0.001$ ) および LVIDd index ( $P < 0.05$ ) が選択された。他の評価変数の VIF は全て  $\leq 10$  であったため、多重共線性はないと判断した。

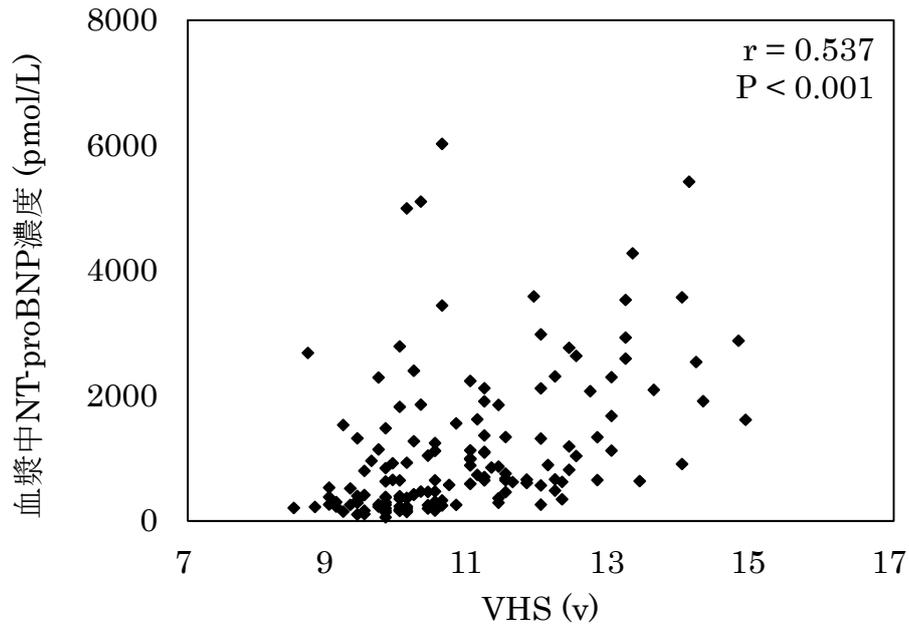


図 2. 血漿中 NT-proBNP 濃度と VHS の相関図

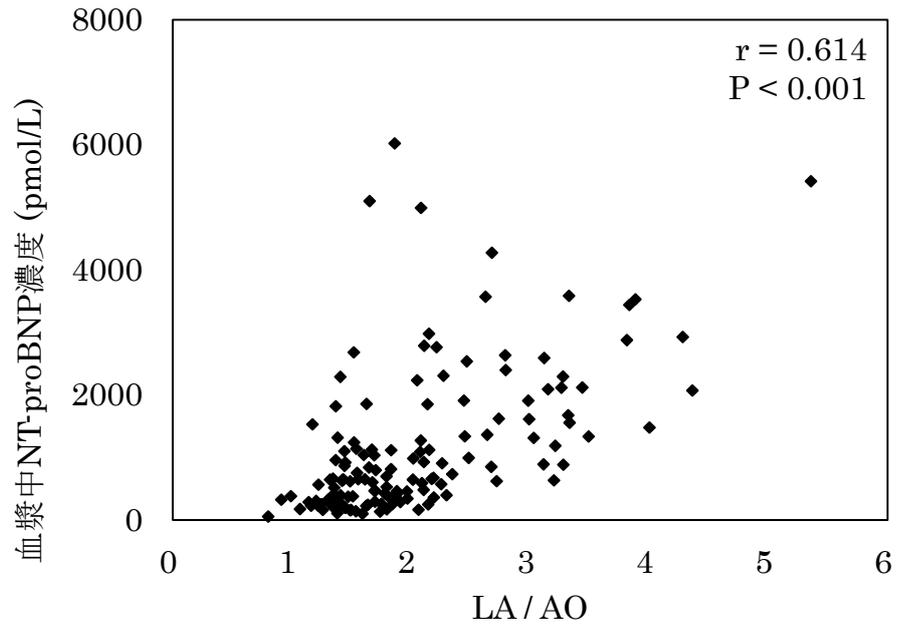


図 3. 血漿中 NT-proBNP 濃度と LA/AO の相関図

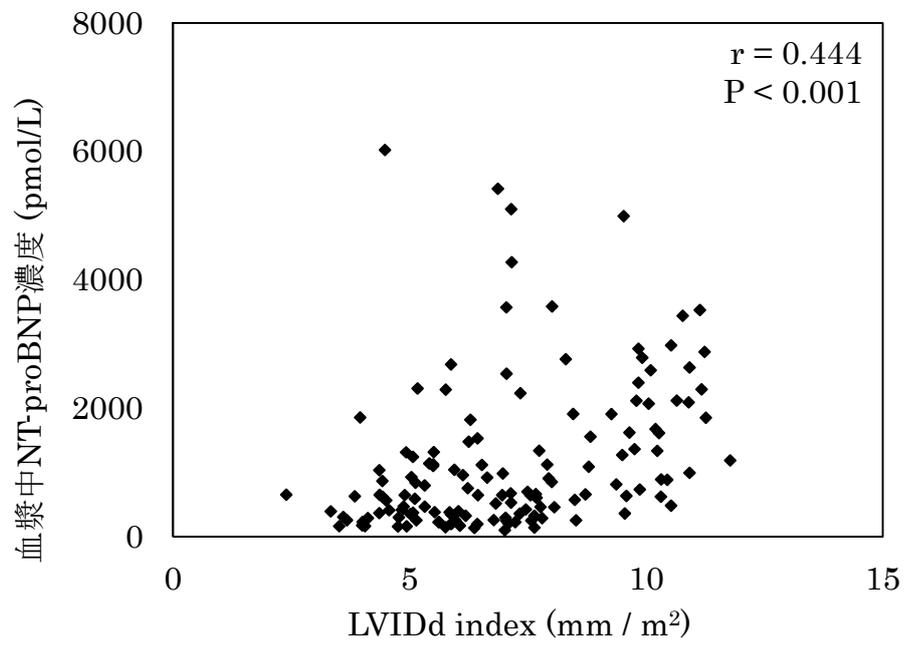


図 4. 血漿中 NT-proBNP 濃度と LVIDd index の相関図

各ステージの MVI を検出するための血漿中 NT-proBNP 濃度の感度、特異度およびそのカットオフ値を求めるための ROC 曲線を図 5 に示した。各重症度の MVI を検出する ROC 曲線より求めた、曲線下面積、感度、特異度およびカットオフ値を表 5 に示した。

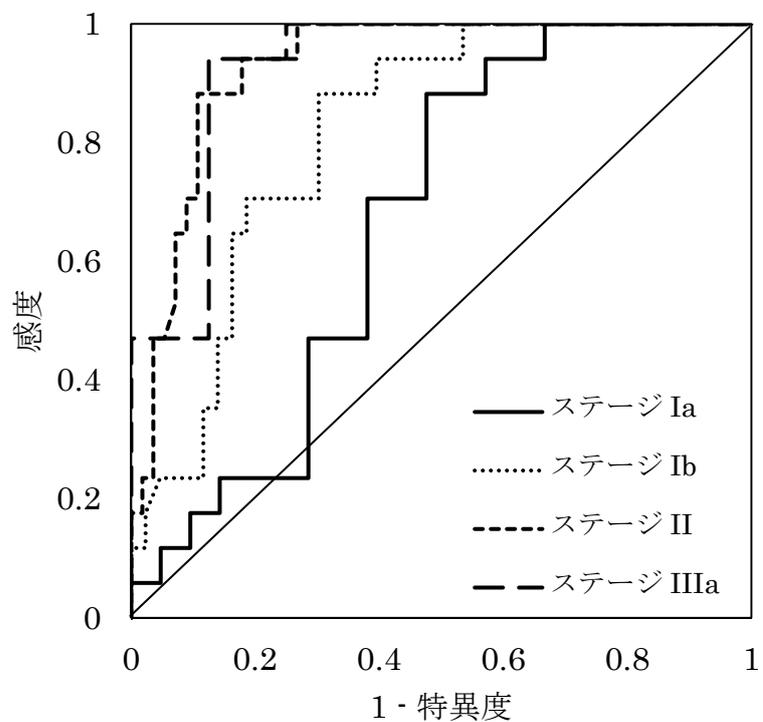


図 5. 血漿中 NT-proBNP 濃度による各ステージのイヌを検出するための ROC 曲線

表 5. ROC 曲線より求めた各ステージの曲線下面積、感度、特異度およびそのカットオフ値

ISACHC ステージ	曲線下面積	感度	特異度	カットオフ値
Ia	0.669	70.6	61.9	314.5
Ib	0.819	88.2	69.8	391.7
II	0.928	94.1	82.1	543.3
IIIa	0.926	94.1	87.5	571.5

(単位: 感度および特異度: %, カットオフ値: pmol/L)

## 検討 2

MVI 群、TVI 群、nonPH 群および PH 群の重症度別に見た血漿中 NT-proBNP 濃度、VHS、LA/AO および ePAP を表 6 に示した。

表 6. MVI 群、TVI 群、nonPH 群および PH 群の重症度別の検査変数

ISACHC ステージ		症例数	NT-proBNP 濃度 (pmol/L)	VHS (v)	LA / AO	ePAP (mmHg)
Ia	MVI 群	21	396.3 (103.1 - 2684.0)	9.8 (8.5 - 10.2)	1.37 (1.07 - 1.59)	-
	TVI 群	10	999.6 (75.0 - 2597.7)	9.8 (9.1 - 10.1)	1.36 (1.19 - 1.52)	-
	nonPH 群	9	951.2 (75.0 - 2597.7)	9.7 (9.1 - 10.1)	1.38 (1.19 - 1.52)	27 (9 - 41)
	PH 群	1	2583.0	10.0	1.34	46
Ib	MVI 群	48	648.8 (137.4 - 6024.0)	10.5 (9.0 - 12.5)	1.79 (0.91 - 4.00)	-
	TVI 群	20	1410.0 (206.9 - 4873.8) †	11.2 (9.8 - 12.9)	1.72 (1.10 - 2.87)	-
	nonPH 群	16	1275.0 (207.0 - 3269.0)	11.1 (9.8 - 12.3)	1.68 (1.10 - 2.04)	22 (7 - 40)
	PH 群	4	2126.5 (1633.0 - 4874.0)	12.1 (11.6 - 12.9) §	2.50 (1.52 - 2.87) §	51 (45 - 57) §
II	MVI 群	56	1114.0 (163.5 - 5102.0)	11.4 (9.7 - 14.9)	2.22 (1.22 - 4.36)	-
	TVI 群	62	2286.4 (130.7 - 12230.0) ‡	12.3 (9.2 - 14.7)	2.68 (1.17 - 4.95)	-
	nonPH 群	30	2011.5 (161.0 - 5271.0)	11.4 (9.6 - 13.8)	2.24 (1.17 - 4.95)	30 (6 - 40)
	PH 群	32	2376.5 (131.0 - 12230.0)	12.7 (9.2 - 14.7) §	2.75 (1.51 - 4.17)*	58 (41 - 163) §
IIIa	MVI 群	8	1551.5 (257.2 - 5419.5)	12.8 (10.8 - 14.3)	2.67 (1.84 - 5.36)	-
	TVI 群	33	3436.0 (274.1 - 12338.1) †	12.7 (10.5 - 15.2)	2.68 (0.91 - 4.24)	-
	nonPH 群	5	2479.0 (274.0 - 5041.0)	11.6 (10.8 - 14.2)	2.09 (1.04 - 3.71)	25 (17 - 39)
	PH 群	28	3724.0 (450.0 - 12338.0)	12.8 (10.5 - 15.2)	2.69 (0.91 - 4.24)	68 (42 - 146) §

†および‡: MVI 群との間に有意差あり (それぞれ P < 0.05 および P < 0.01)

\*および§: nonPH 群との間に有意差あり (それぞれ P < 0.05 および P < 0.01)

ステージ Ib、II および IIIa では、TVI 群の血漿中 NT-proBNP 濃度は MVI 群のそれよりも有意に高値だった (MVI 群 vs TVI 群: Ib, 648.8 [137.4 - 6024.0] vs 1410.0 [206.9 - 4873.8],  $P < 0.05$ ; II, 1114.0 [163.5 - 5102.0] vs 2286.4 [130.7 - 12230.0],  $P < 0.01$ ; IIIa, 1551.5 [257.2 - 5419.5] vs 3436.0 [247.1 - 5041.0],  $P < 0.05$ ) (図 6)。

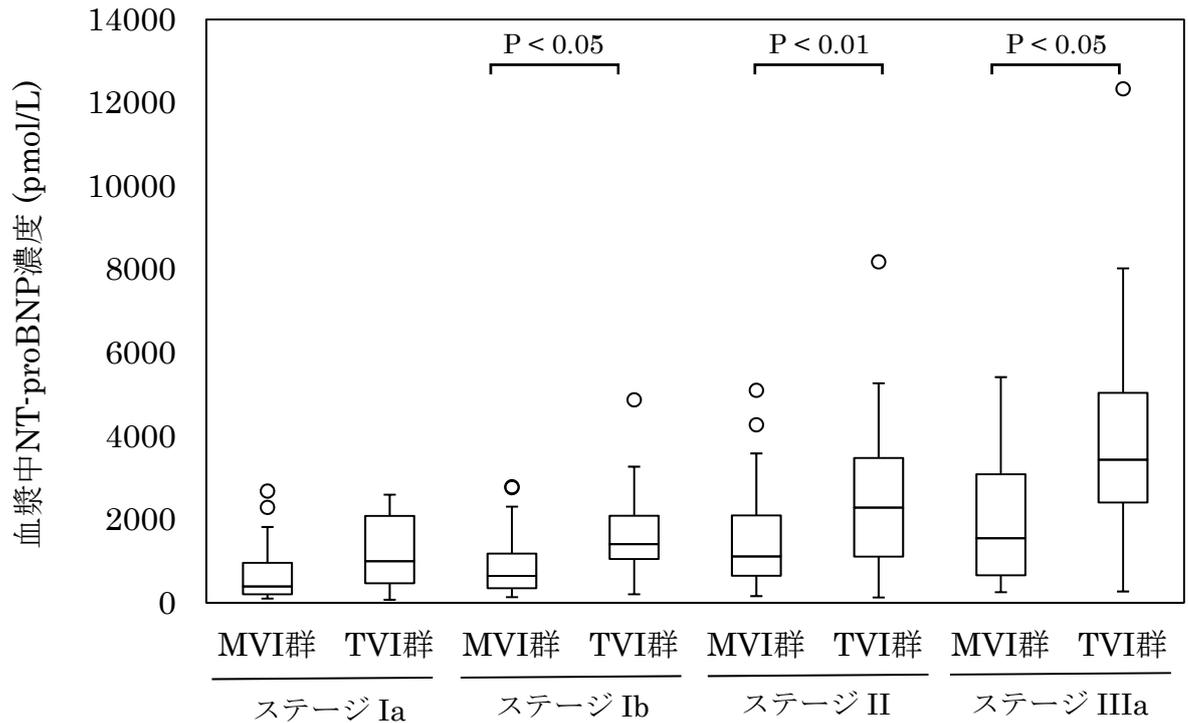


図 6. MVI 群および TVI 群の各ステージにおける血漿中 NT-proBNP 濃度の箱髭図。箱の中央の線は中央値、箱の上端および下端はそれぞれ 75 % タイル値および 25 % タイル値、髭の上端および下端は四分位範囲の 1.5 倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。そして○は外れ値を示す。

ISACHC ステージ Ib、II および IIIa の nonPH 群および PH 群の血漿中 NT-proBNP 濃度の間には有意差は認められなかった (図 7)。ステージ Ia の PH 群は 1 頭のみであったので、統計学的な比較は実施できなかった。

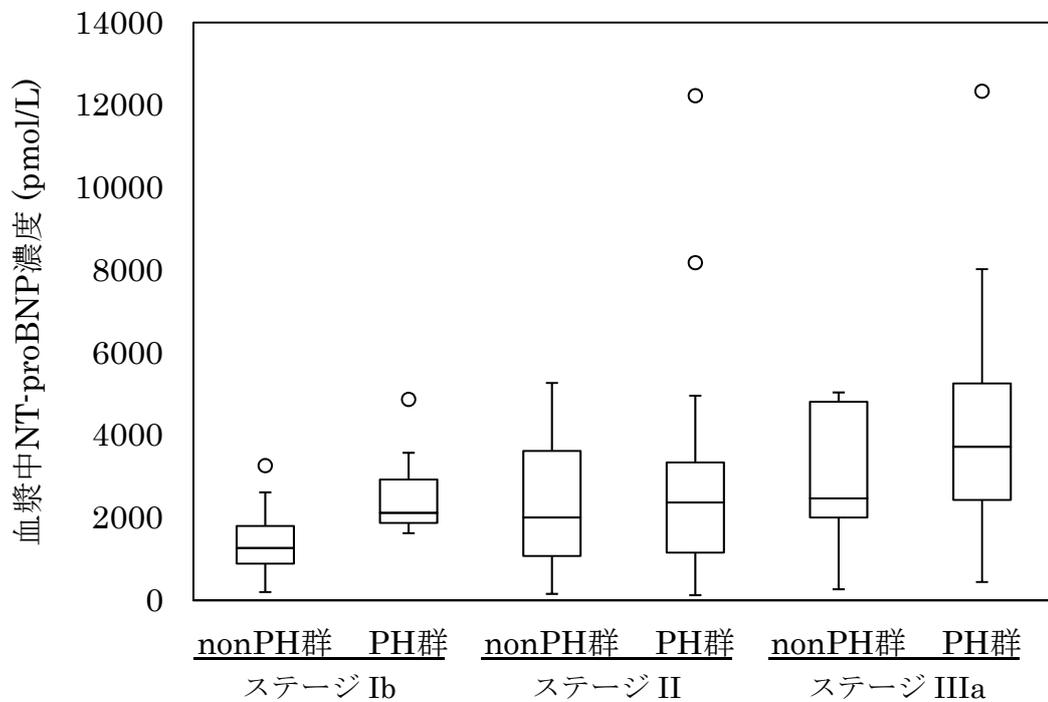


図 7. nonPH 群および PH 群の各重症度における血漿中 NT-proBNP 濃度の箱髭図。箱の中央の線は中央値、箱の上端および下端はそれぞれ 75 % タイル値および 25 % タイル値、髭の下端および上端はそれぞれ、四分位範囲の 1.5 倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。そして○は外れ値を示す。

いずれの ISACHC ステージでも MVI 群および TVI 群の VHS の間に有意差は認められなかった。ステージ Ib および II では、PH 群の VHS は nonPH 群のそれよりも有意に高値だったが (いずれも  $P < 0.01$ )、ステージ IIIa では nonPH 群および PH 群の VHS は有意に異ならなかった。

いずれの ISACHC ステージにおいても MVI 群および TVI 群の LA/AO の間に有意差は認められなかった。ステージ Ib では、PH 群の LA/AO は nonPH 群のそれよりも有意に高値だったが ( $P < 0.05$ )、ステージ II および IIIa では nonPH 群と PH 群の間に有意差は認められなかった。

TVI、あるいは TVI および PH の合併を検出する際の血漿中 NT-proBNP 濃度の ROC 曲線から求めた曲線下面積、感度、特異度およびカットオフ値を表 7 に示した。

表 7. ROC 曲線より求めた各ステージの曲線下面積、感度、特異度およびカットオフ値

検出対象	ISACHC ステージ	曲線下面積	感度	特異度	カットオフ値
TVI	Ia	0.660	80.0	57.1	418.0
	Ib	0.700	80.0	67.4	929.8
	II	0.670	59.7	71.4	1911.0
	IIIa	0.750	90.9	62.5	1913.0
PH	Ib	0.810	100	68.8	1448.0
	II	0.520	59.4	53.3	2016.0
	IIIa	0.650	92.9	40.0	2013.0

(単位: 感度および特異度: %, カットオフ値: pmol/L)

血漿中 NT-proBNP 濃度および ePAP には有意な正の相関が認められた (図 8)。

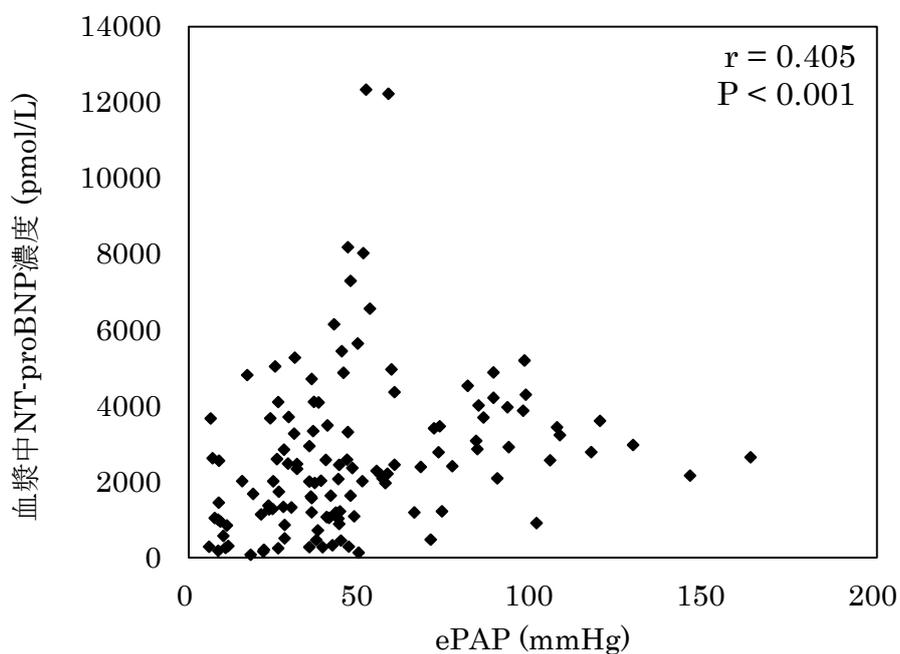


図 8. 血漿中 NT-proBNP 濃度と推定肺動脈圧 (ePAP)の相関図。

#### 4. 考察

検討1では、MVI群のイヌのうち心拡大が確認された症例（すなわちISACHC ステージ Ib 以上）の血漿中 NT-proBNP 濃度は正常群のそれと比較して有意に上昇していた。また、ステージ別に見ると MVI の重症化に伴って血漿中 NT-proBNP 濃度は増加傾向を示した。以上の所見は、血漿中 NT-proBNP 濃度の上昇は僧帽弁逆流の存在ではなく、これに続発した心拡大を反映すると考えられた。加えて、血漿中 NT-proBNP 濃度が VHS、LA/AO および LVIDd index と有意に相関したこと、そして重回帰分析では血漿中 NT-proBNP 濃度を決定する変数として LA/AO および LVIDd index が選択されたことも、血漿中 NT-proBNP 濃度は左房および左室の容量負荷の程度に伴って上昇することを示していると考えられる。しかし、血漿中 NT-proBNP 濃度の範囲は、いずれのステージでも非常に広く、他のステージの濃度とオーバーラップした症例が多かった。この原因として、本検討で用いた ISACHC の心不全分類に起因した可能性、そして第2、3および4章で検討した測定内および測定間変動、日内変動、食事および運動による変動、そして腎機能による変動が関与した可能性があると考えられた。このうち特に ISACHC の心不全分類では、ステージ II には軽度の心不全徴候の認められる症例から、安静時には心不全徴候が認められないものの、心臓が重度に拡大している症例が含まれる。すなわち、ステージ II には心負荷の程度が様々な症例が含まれ、これが血漿中 NT-proBNP 濃度が広範囲に分布した原因の一つと考えられる。

NT-proBNP を含む心臓バイオマーカーに期待されることの一つは、初期段階の疾患を高い信頼性をもって検出することである。しかし、ROC 曲線の解析結果では、ISACHC ステージ Ia の感度はわずか 70.6 % であり、臨床現場では使用できないと考えられた。MVI のイヌでは心雑音が聴取されるため、聴診に勝るスクリーニング方法はないと考えられる。実際に、本検討に用いた全ての症例で MVI による収縮期逆流性雑音が聴取された。そのため、MVI のスクリーニング検査として、血漿中 NT-proBNP 濃度よりも聴診の方が優れていると判断された。

検討2では、ISACHC ステージ Ib 以上の TVI 群の血漿中 NT-proBNP 濃度は MVI 群のそれよりも上昇することを明らかにした。加えて、以前のイヌ

の研究と同様[44, 51]、検討 2 でも血漿中 NT-proBNP 濃度および ePAP は有意に相関することを確認した。これらの所見は、右心負荷の増大によっても心臓からの NT-proBNP の放出は刺激される可能性を示している。しかし、血漿中 NT-proBNP 濃度により TVI の合併を検出する感度および特異度はステージ Ia、Ib および II では十分ではなかった。ステージ IIIa では、感度 (90.9%) は良好だったが、特異度 (62.5 %) は不十分だった。したがって、血漿中 NT-proBNP 濃度により MVI のイヌでの TVI の合併を信頼性をもって除外することは困難だと考えられた。

ヒトでは、右心系の BNP の分泌量は左心系と比較して少ないと報告されている [76]。このことがイヌに該当すると仮定すると、TVI を合併した MVI のイヌは血漿 BNP 濃度、そしておそらく血漿中 NT-proBNP 濃度を顕著に上昇させることができないかもしれない。このことは、血漿中 NT-proBNP 濃度は十分な感度および/または特異度を持って TVI の合併を検出できなかった、という検討 2 の結果を説明している可能性がある。もう一つの可能性として、MVI 群および TVI 群の各ステージでみられた、血漿中 NT-proBNP 濃度の非常に幅広い分布が挙げられる。これは、検討 1 でも考察したように ISACHC の心不全分類に起因する可能性があると考えられた。

検討 2 では、PH を検出する血漿中 NT-proBNP 濃度の感度は、ステージ Ib および IIIa でそれぞれ 100 および 92.9% と良好だった。しかし、ステージ Ib の PH 群が 4 頭と少なかったため、このステージについてはより多くの症例を追加して検討すべきだと思われる。これに対して、ステージ IIIa での感度 (92.9 %) は臨床応用に耐え得ると考えられたが、特異度 (40.0 %) は不十分だった。したがって、MVI のイヌでは TVI と同様に、PH の合併を血漿中 NT-proBNP 濃度のみで信頼性をもって除外することは困難だと考えられた。

検討 1 で ROC 曲線より求めた各ステージの MVI の症例を検出する際のカットオフ値は、IDEXX LABORATORIES 株式会社が推奨する値と大きく異なっていた。同社が公開している解釈基準で、血漿中 NT-proBNP 濃度が 900 pmol/L 未満の場合、心筋の負荷が増大している可能性は低いと考えられ、現時点では臨床的に有意な心疾患の可能性は低いと考えられるとしている [47]。しかし、検討 1 で得られた心不全徴候が認められるステージ II の症例を検出するカッ

トオフ値は、543.3 pmol/L であり、その感度は 94.1 %であった。すなわち、TVI を合併していない、MVI の症例に同社の基準を用いると、心疾患が存在する可能性を過小評価する可能性があると考えられる。検討 1 で得られたカットオフ値は MVI のイヌで過去に報告された値 (445 pmol/L [82]、491 pmol/L [104]) と近似していた。検討 2 の結果も考慮すると、TVI を併発した症例に対する値であれば 900 pmol/L は妥当だと考えられるが、MVI のみの症例に対しては、この値未満であっても MVI の存在を考慮する必要があると思われる。加えて、MVI のみのイヌ、そして MVI に TVI が合併したイヌに分けて血漿中 NT-proBNP 濃度のカットオフ値を設定することで、心臓バイオマーカーとしての血漿中 NT-proBNP 濃度の有用性が高まる可能性があると考えられた。

本研究には 2 つの制限がある。血漿中 NT-proBNP 濃度は腎機能の影響を受けることが第 4 章でも、他の報告でも確認されている [89, 96]。本章の検討で扱った症例の一部では、血液検査および尿検査を実施していないため、腎機能が低下した症例を組み込んだ可能性がある。次に、ステージ Ia および Ib の PH 群、そしてステージ IIIa の MVI 群および nonPH 群の症例数が少なかったという事実は、本章での検討の特に特異度に悪影響を及ぼした可能性がある。ステージ Ia および Ib 程度では肺高血圧を併発することはまれである。

## 5. 小括

本章では、MVI または MVI に TVI を併発したイヌの血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を検討した。

検討 1 により、MVI のイヌでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は MVI の存在ではなく、これに続発した心拡大により上昇することが明らかになった。しかし、特に初期の MVI を検出するためのスクリーニング検査としての有用性は低いことも判明した。加えて、血漿中 NT-proBNP 濃度は左房および左室の容量負荷の増大と関連して増加することも本章で確認され、このことから、同一症例の左心系の容量負荷を経時的に追跡評価する場合に有用な可能性があることが示唆された。MVI を検出するためのカットオフ値については、TVI を合併していない MVI の症例では NT-proBNP の測定を受注している検査会社が公開しているカットオフ値では、MVI が存在する可能性を過小評価するリスクがある

ことが判った。また、MVI のイヌの血漿中 NT-proBNP 濃度は TVI または PH の合併により有意に上昇すること、そしてこれらの合併は十分な感度を持って検出できるが、これらの除外は特異度の点で困難であることを本章での検討により確認できた。

## 第 6 章

肥大型心筋症に罹患したネコにおける血漿中 N

末端 **proB** 型ナトリウム利尿ペプチド濃度の

診断的意義の検討

## 1. 緒言

一般に、ネコの左室肥大の原因には、肥大型心筋症 (HCM)、甲状腺機能亢進症および全身性高血圧が含まれる。ネコの心疾患の 62%が心筋症であり、HCM は心筋症の 58 - 68%を占める [32, 61, 93]。HCM は左室壁、中隔壁または乳頭筋の肥大を特徴とする [61]。重度な HCM では、肺水腫または胸水による重度の呼吸困難、あるいは動脈血栓塞栓症に陥ることが多い。特に後者に関しては、両後肢の急性の完全または不完全麻痺として認められることが圧倒的に多い。また、左室流出路閉塞、そしてそれによる僧帽弁の収縮期前方運動 (SAM)が見られる場合もある。このような症例では心雑音が聴取されるが、これらの異常は HCM ネコでは必ずしも認められるとは限らない [10, 94]。すなわち、HCM に罹患しているものの、心不全徴候を全く示さないネコでは、心臓の聴診を含む身体検査のみでは疑診されないことが多い。加えて、胸部 X 線検査による HCM の検出能は非常に低い [46, 61]。一般臨床現場では、HCM の確定診断に不可欠な心エコー図検査は心不全を示唆する徴候または身体検査所見が認められた際には積極的に実施される。しかし、反対に検査適応となる何らかの異常所見が見られない症例では、心エコー図検査は実施されない。既に述べたように、無徴候の HCM ネコの身体検査および聴診所見は正常であることも多く、このような症例では心エコー図検査は実施されることはなく、HCM の存在は見逃されている可能性が高い。

HCM のヒトでは、血漿 N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)濃度は New York Heart Association の心機能分類、左房径、心室の拡張障害程度、左室流出路での圧較差、そして左室肥大の程度と有意に相関し [2, 55]、心不全の重症度、生命予後、そして治療効果を予測する因子の 1 つとして重要視されている [2, 41]。

ヒトと同様、ネコでも NT-proBNP、心房性ナトリウム利尿ペプチドおよびトロポニンなどの心臓バイオマーカーの臨床的意義が調査されてきた。このうち、NT-proBNP 濃度は心筋症ではうっ血徴候が存在しなくとも上昇するが、うっ血徴候が存在するとさらに上昇する [22]。呼吸器徴候の原因を心臓性または非心臓性に鑑別する際にも血漿中 NT-proBNP 濃度は有用である [23, 35, 101]。血漿中 NT-proBNP 濃度による無徴候の HCM の検出に関しては、可能

とする報告があるいっぽうで [22]、不可能だったとする報告もある [62]。更に、ネコでは血漿中 NT-proBNP 濃度と心エコー図検査変数の関連性を評価した報告はない。この関連性が確認できれば、ヒトおよびイヌと同様に、血漿中 NT-proBNP 濃度が HCM ネコの検出および重症度判定に使用できる可能性がある。そこで、本章では、HCM ネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の臨床的意義を検討した。なお、本章の内容の一部は既に *Journal of Veterinary Medical Science* に公表済みである [111]。

## 2. 材料および方法

2007年3月から2013年3月の間に本学附属動物医療センター循環器科を受診したネコのカルテを回顧的に再評価した。カルテに問診および身体検査の所見が記載されており、血液生化学検査、血圧測定、心電図検査、胸部 X 線検査、心エコー図検査および血漿中 NT-proBNP 濃度に関するデータが利用可能なネコを本検討に組み込んだ。二次的に心室肥大を引き起こす大動脈弁狭窄症または全身性高血圧症 (収縮期血圧  $\geq 160$  mmHg) のネコ、甲状腺機能亢進症と一致する臨床徴候を示すネコ、高窒素血症 (クレアチニン濃度  $\geq 1.6$  mg/dL) が確認されたネコ、そして年齢が 10 歳以上のネコは除外した。本研究に組み込んだネコは、各種検査により臨床的に健康であった正常群、無徴候性 HCM (AHCM) 群、そして徴候性 HCM (SHCM) 群に分類された。さらに、AHCM 群は、左房拡大が認められなかった LAE- 群および左房拡大の認められた LAE+ 群に細分類した。なお、結果で述べたように、SHCM 群では全例に左房拡大が認められたため、左房拡大の有無による症例の細分類は実施しなかった。本検討では、右側傍胸骨から描出した左室短軸像の M モード法によって測定された拡張末期心室中隔壁厚 (IVSd) および/または拡張末期左室後壁厚 (LVPWd) が 6 mm 以上であったネコを HCM と判断した [61]。また、右側傍胸骨から描出した心基部短軸像の B モード法で左房/大動脈根内径比 (LA/AO) を測定し、この比が 1.6 以上であった場合、左房拡大ありと判断した [61]。

全てのネコに関して年齢、体重、心拍数、血漿中 NT-proBNP 濃度および心エコー図検査変数 (左房径 [LAD]、LA/AO、IVSd、拡張末期左室内径 [LVIDd]、LVPWd および左室内径短縮率 [FS]) が再評価された。全ての心エコー図検査

は、全てのネコで意識下にて1名の獣医師により同一の機器 (Vivid7 dimension, GE Healthcare, Tokyo, Japan)で実施されていた。

得られた結果は全て中央値 (最小値 - 最大値)で示した。正規性は Shapiro-Wilk 検定により評価された。各変数の3群間の比較には、Mann-Whitney U 検定および Bonferroni 補正法を用いた。血漿中 NT-proBNP 濃度および心エコー図検査変数の相関性は、Spearman の順位相関係数により評価した。P < 0.05 を有意とした。血漿中 NT-proBNP 濃度を従属因子とした重回帰分析を実施し、多重共線性の評価および血漿中 NT-proBNP 濃度の決定要因を評価した。多重共線性の判定は分散インフレ係数 (VIF)を用い、VIF  $\geq$  10 を多重共線性ありと判断した。受信者動作特性(ROC)曲線は、AHCM および SHCM を検出するための血漿中 NT-proBNP 濃度の診断精度およびカットオフ値を設定するために用いた。全ての統計処理および ROC 曲線の作成は市販の統計ソフト(Dr. SPSS II for Windows, Version 11.0, 1J,SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan)を用いて行った。

### 3. 結果

95頭のネコが本検討に組み込まれた。各群のネコの症例数、年齢、性別、体重、そして心雑音の有無および強度を表1に示した。

表 1. 各群のプロフィール

	正常群	AHCM 群			SHCM 群
		合計	LAE-群	LAE+群	
症例数	33	52	30	22	10
年齢 (齡)	4.0 (0.6 - 9.9)	7.0 (0.7 - 9.7)	7.4 (0.7 - 9.7)	6.6 (4.9 - 9.7)	8.1 (5.9 - 8.5)
性別 (n)					
雄	15	2	2	0	0
去勢雄	4	39	22	17	9
雌	7	4	3	1	1
避妊雌	7	7	3	4	0
体重 (kg)	4.1 (2.3 - 6.7)	5.6 (3.8 - 7.5)	5.6 (4.1 - 7.5)	5.6 (3.8 - 6.8)	4.8 (3.8 - 5.2)
心雑音 (n, [%])	0 (0)	37 (71.2)	22 (73.3)	15 (68.2)	6 (60.0)
Levine グレード (n)					
1/6	0	2	1	1	0
2/6	0	12	7	5	1
3/6	0	22	14	8	1
4/6	0	1	0	1	4
5/6	0	0	0	0	0
6/6	0	0	0	0	0

組み込み時に AHCM 群および SHCM 群のネコに投与されていた心不全治療薬を表 2 に示した。

表 2. 組み込み時に AHCM 群および SHCM 群に投与されていた心不全治療薬の内訳

	AHCM 群	SHCM 群
ACEI	10	0
ACEI+ $\beta$ -受容体遮断薬	5	0
ACEI+CCB	12	0
ACEI+PBD	4	0
$\beta$ -受容体遮断薬+CCB	1	0
ACEI+ $\beta$ -受容体遮断薬+CCB	1	0
ACEI+CCB+フロセミド	0	1
ACEI+CCB+PBD	2	3
ACEI+CCB+スピロラクトン+サイアザイド系利尿薬	0	1
ACEI+PBD+CCB+スピロラクトン+サイアザイド系利尿薬	6	5
合計	41	10
投薬されていたネコの割合 (%)	78.8	100

ACEI: アンギオテンシン変換酵素阻害剤、CCB: カルシウムチャネル拮抗薬

PBD: ピモベンダン

SHCM 群のネコに見られた心不全徴候は、運動不耐性 (n = 10 / 10)、および胸水による呼吸困難 (n = 2 / 10)であった。各群の心拍数、LAD、LA / AO、IVSd、LVIDd、LVPWd および FS を表 3 に示した。

表 3. 各群の心拍数、LA / AO、IVSd、LVIDd、LVPWd および FS

		正常群	AHCM 群	SHCM 群
症例数	-	33	52	10
心拍数	[bpm]	180 (107 - 218)	180 (120 - 240)	219 (150 - 240)
LAD	[mm]	10.4 <sup>†</sup> (6.9 - 13.2)	13.5 <sup>†</sup> (7.8 - 36.2)	33.8 <sup>†</sup> (21.5 - 43.8)
LA / AO	-	1.28 <sup>†</sup> (0.81 - 1.48)	1.54 <sup>†</sup> (0.84 - 4.60)	3.92 <sup>†</sup> (2.93 - 5.28)
IVSd	[mm]	4.2 <sup>†, ‡</sup> (2.5 - 5.1)	6.3 <sup>†</sup> (2.8 - 12.1)	5.7 <sup>‡</sup> (5.0 - 7.0)
LVIDd	[mm]	15.0 (10.9 - 18.8)	15.1 (6.1 - 20.6)	16.3 (12.8 - 18.8)
LVPWd	[mm]	4.4 <sup>†, ‡</sup> (2.7 - 5.9)	6.4 <sup>†</sup> (3.4 - 10.5)	5.8 <sup>‡</sup> (4.9 - 7.8)
FS	[%]	46.4 (27.0 - 72.8)	50.7 (23.1 - 72.9)	40.5 (5.6 - 61.7)

† および ‡ 同一の記号間で有意差あり (P < 0.001)

血漿中 NT-proBNP 濃度は、正常群では 30.0 (24.0 - 152.1)、AHCM 群では 537.2 (24.0 - 1379.0)、そして SHCM 群では 971.9 (520.1 - 1213.9) pmol/L であった。AHCM 群および SHCM 群の血漿中 NT-proBNP 濃度は、正常群のそれと比べてそれぞれ有意に高値を示し(いずれも  $P < 0.001$ )、SHCM 群のそれは AHCM 群のそれよりも有意に高値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 1)。

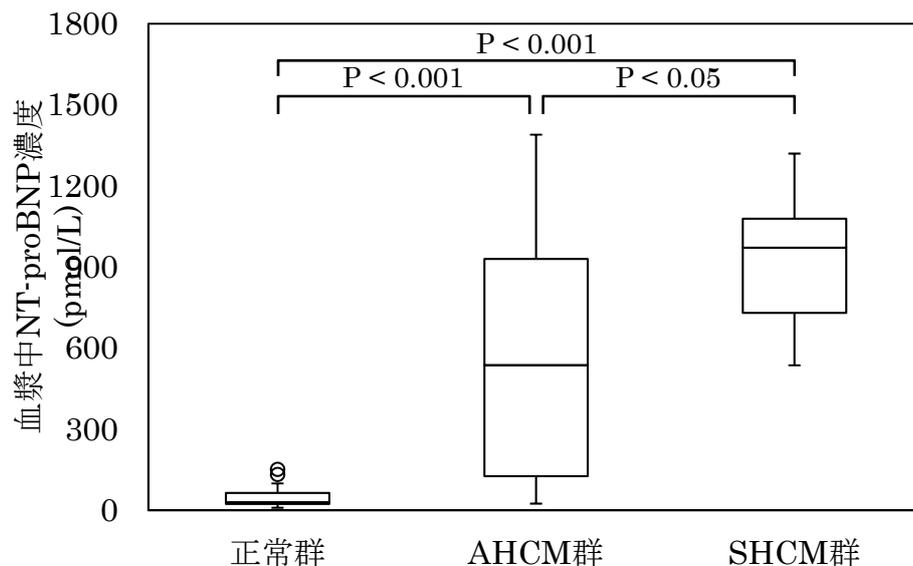


図 1. 正常群、AHCM 群および SHCM 群の血漿中 NT-proBNP 濃度の箱髭図。箱の中央の線は中央値、箱の上端および下端はそれぞれ 75 %タイル値および 25 %タイル値、髭の下端および上端はそれぞれ、四分位範囲の 1.5 倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。○は外れ値を示す。

LAE-群および LAE+群の血漿中 NT-proBNP 濃度はそれぞれ 350.1 (40.0 - 1379.0)および 750.5 (24.0 - 1326.0) pmol/L であり、この両群間に有意差は認められなかった。しかし、LAE-群および LAE+群はいずれも正常群よりも有意に高値を示した (いずれも  $P < 0.001$ ) (図 2)。

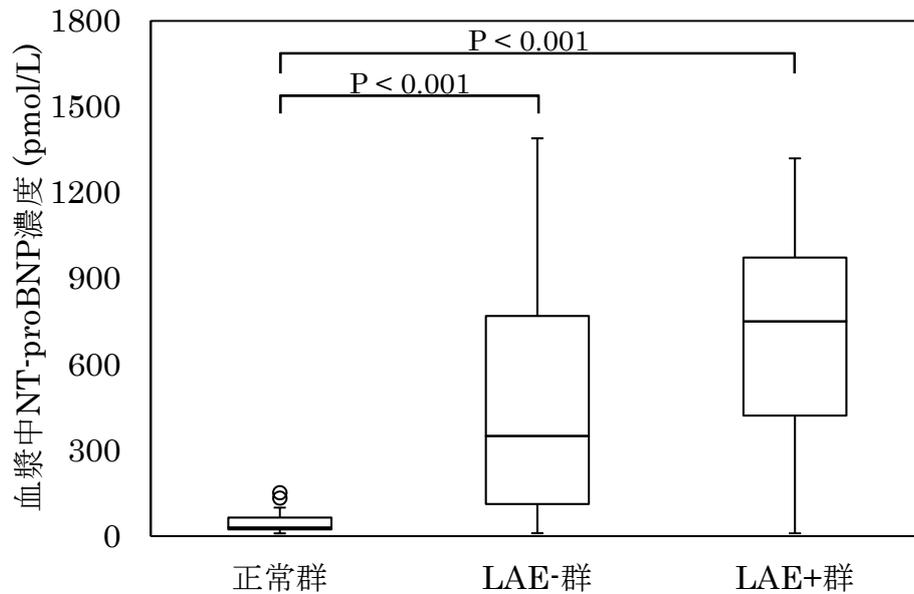


図 2. 正常群、LAE-群および LAE+群の血漿中 NT-proBNP 濃度の箱髭図。箱の中央の線は中央値、箱の上端および下端はそれぞれ 75 %タイル値および 25 %タイル値、髭の下端および上端はそれぞれ、四分位範囲の 1.5 倍の限界値以内に存在する最低値と最高値をそれぞれ示す。○は外れ値を示す。

図 3-8 に示したように、血漿中 NT-proBNP 濃度は LAD、LA/AO、IVSd、LVPWd および FS と有意に相関したが、LVIDd は血漿中 NT-proBNP 濃度と有意に相関しなかった。

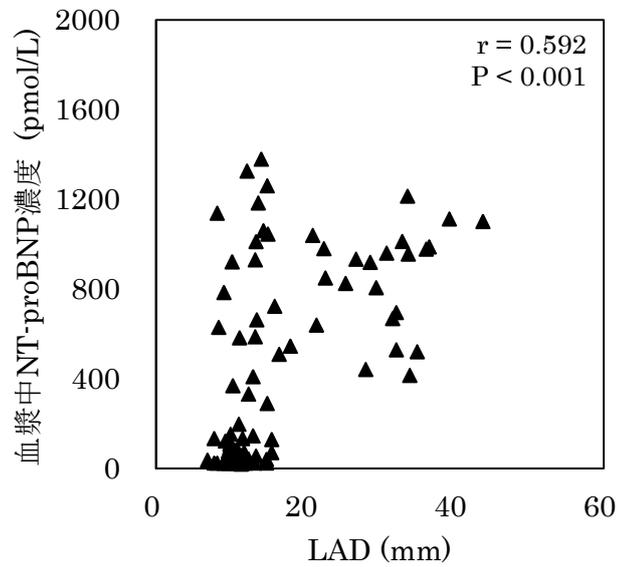


図 3. 血漿中 NT-proBNP 濃度と LAD の相関図

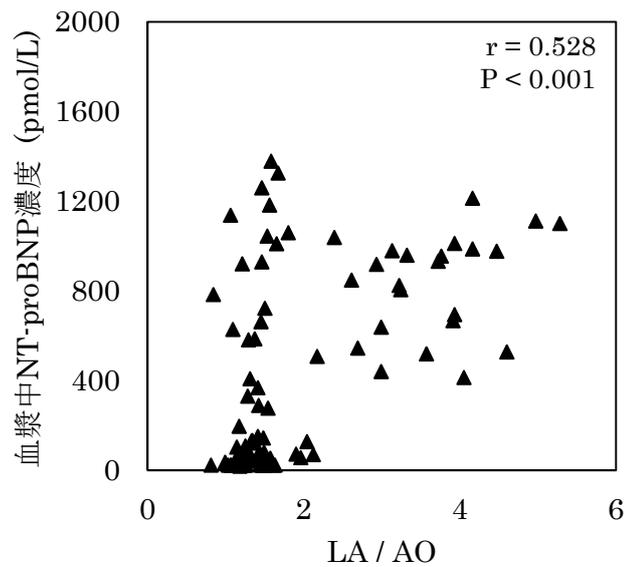


図 4. 血漿中 NT-proBNP 濃度と LA/AO の相関図

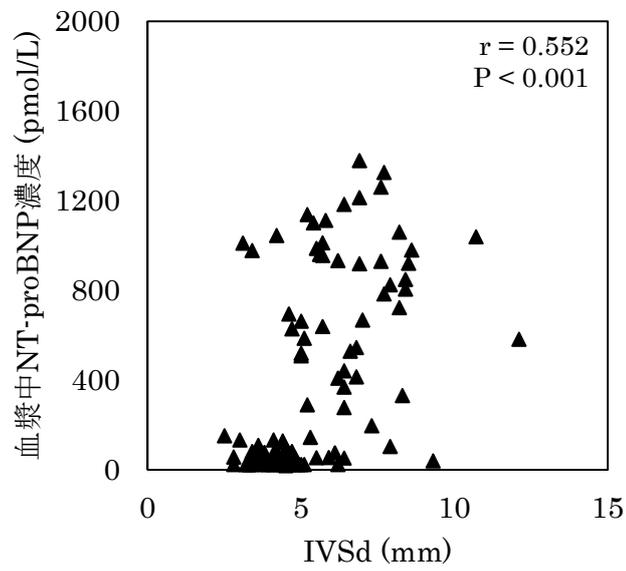


図 5. 血漿中 NT-proBNP 濃度と IVSd の相関図

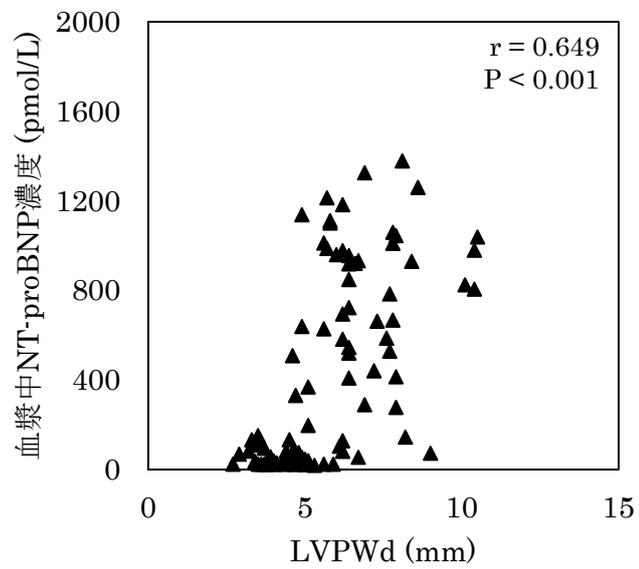


図 6. 血漿中 NT-proBNP と LVPWd の相関図

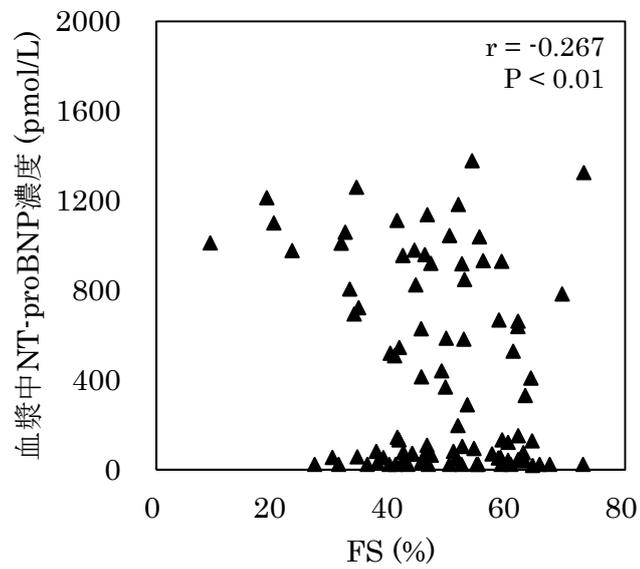


図 7. 血漿中 NT-proBNP 濃度と FS の相関図

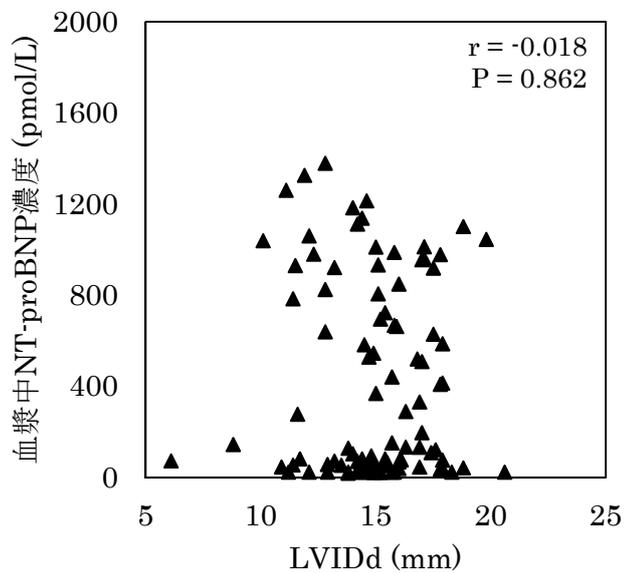


図 8. 血漿中 NT-proBNP 濃度と LVIDd の相関図

重回帰分析より、血漿中 NT-proBNP 濃度の決定要因として LAD ( $P < 0.05$ ) および LVPWd ( $P < 0.01$ )の 2 変数が選択された。各変数の VIF は、それぞれ SBP では 1.19、LAD では 1.40、LA / AO では 31.61、IVSd では 1.57、LVIDd では 1.23、そして LVPWd では 1.24 であり、LA / AO のみ多重共線性ありと判断した。

血漿中 NT-proBNP 濃度によって AHCM および SHCM を検出する際の感度、特異度およびそのカットオフ値を ROC 曲線の解析により評価した (図 9)。その曲線下面積、感度、特異度およびカットオフ値は AHCM 群では、0.946、83.9 %、93.9 % および 99.6 pmol/L、そして SHCM 群では、1、100 %、100 % および 336.1 pmol/L であった。

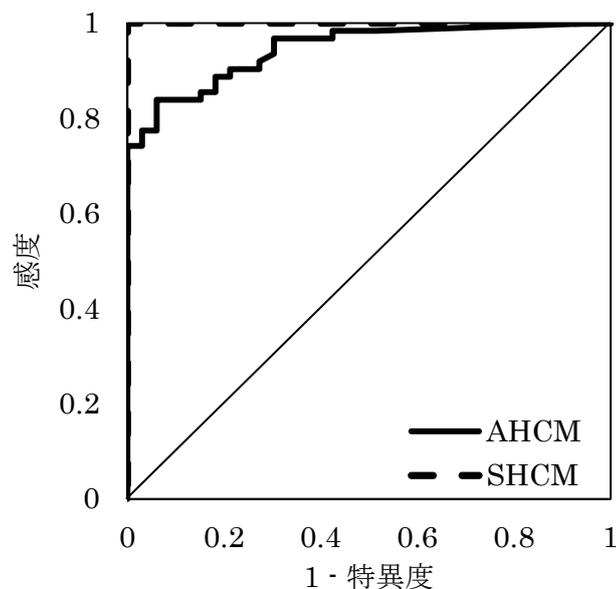


図 9. 血漿中 NT-proBNP 濃度による AHCM および SHCM を検出する ROC 曲線

#### 4. 考察

ヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は心疾患の重症度に伴って上昇する [2, 41, 55]。また、イヌでも同様の所見が報告されており、この点は本研究 (第 5 章)でも確認できた [82, 104, 107]。HCM のヒトでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は無徴候の患者と比較して心不全徴候を呈する症例では有意に高値を示す

[41, 55]。イヌでは、HCM の発生が極めて少ないため [70]、HCM のイヌでの血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義は、我々の知る限り報告されていない。それに対してネコでは、HCM は最も一般的に見られる心疾患である。しかし、特に無徴候の HCM ネコでは、聴診を含む身体検査所見が正常であることが多く、その検出が非常に困難である。そのため、無徴候の HCM を高い信頼性を持って検出できるツールが求められている。

本章での検討により、血漿中 NT-proBNP 濃度は正常群と比較して AHCM 群では有意に上昇し、さらに AHCM 群よりも SHCM 群は有意に高値を示すことを明らかにした。また、血漿中 NT-proBNP 濃度の上昇は左房の拡張が認められなくとも左室肥大のみで有意に上昇することも明らかにした。

血漿中 NT-proBNP 濃度は、LAD、LA / AO、IVSd、LVPWd および FS と有意に相関した。さらに重回帰分析より、血漿中 NT-proBNP 濃度を決定する要因として LAD および LVPWd が選択された。このことは、心房拡張、そして心室 (特に左室後壁) の肥大によって血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇することを示している。LAE-群の血漿中 NT-proBNP 濃度が正常群と比較して有意に高値を示したことより、HCM に罹患したネコでの血漿中 NT-proBNP 濃度は、まず心室肥大に伴って上昇すると考えられる。免疫組織学的検討により、正常なネコの心臓では、BNP は心房のみに限局して存在するが、HCM のネコでは、心房のみでなく心室に BNP が存在することが報告されている [9]。本章の検討でも、HCM ネコでは左室肥大に伴って BNP の合成が刺激され、それに合わせて血漿中 NT-proBNP 濃度も上昇したと予想される。また、IVSd および LVPWd は AHCM 群および SHCM 群の間に有意差が認められず、LAD では 2 群間に有意差が確認されたことより、心肥大による血漿中 NT-proBNP 濃度の増加に加え、左房拡大によって血漿中 NT-proBNP 濃度がさらに上昇したと考えられる。

LAD は左房圧の上昇と関連して増加する [37]。本検討では LAD が血漿中 NT-proBNP 濃度と有意に相関したことより、血漿中 NT-proBNP 濃度は左房圧とも関連して増加する可能性がある。ヒトおよびイヌでは、血漿中 NT-proBNP 濃度はうっ血性心不全や死亡のリスク評価に有用である [19, 74, 86]。ネコではこの種の報告はないが、左房径の増加は左房内での血栓形成のり

スクであり、左房圧の上昇は肺水腫を引き起こす [61]。したがって、本検討で確認された LAD の予測に血漿中 NT-proBNP 濃度が使用できることを考慮すると、この濃度により血栓形成および肺水腫のリスクを評価することが可能であるかもしれない。

AHCM を検出する感度 (83.9 %) および特異度 (93.9 %) は臨床応用に耐え得る精度であると考えられる。ネコでは HCM の好発品種としてメインクーン、アメリカン・ショートヘアー、ペルシャ、ブリティッシュ・ショートヘアー、ノルウェイジャン・フォレスト・キャット、ラグドール、ターキッシュ・バンおよびスコティッシュ・フォールドなどが報告されている [61]。加えて、日本では在来短毛種での発生も多いと思われる。これらの品種では、HCM のスクリーニング検査に血漿中 NT-proBNP 濃度を組み込むことにより、特に無徴候の HCM の個体がより効果的に検出できると考えられた。すなわち、血漿中 NT-proBNP 濃度が本検討で求めたカットオフ値 (99.6 pmol/L) を上回っていたネコでは HCM の可能性が高いと判断し、心エコー図検査を推奨すべきであると考えられた。こうした対応により、不必要な心エコー図検査を回避し、患者の身体的負担および飼い主の経済的負担を軽減できると考えられた。

本章の検討で、AHCM 群の血漿中 NT-proBNP 濃度は非常に広範囲に分布していた。一般に HCM ネコの多くが無徴候である [61]。さらに、HCM に関連した臨床徴候は、多くのネコでうっ血性心不全に至るまで発現しない。うっ血性心不全は HCM ネコの 1/3 から 1/2 で認められ、そしてその徴候としては運動不耐性、安静時呼吸数の増加、呼吸困難、無関心、動脈血栓塞栓症などが含まれる [61]。これらのうち、比較的早期に発現する運動不耐性または安静時呼吸数の増加は、飼い主が認知しうる徴候であるが、見落とされることも多く、HCM ネコの多くが呼吸困難および動脈血栓塞栓症といった激的な臨床徴候を呈するまで認知されない可能性がある。本検討で血漿中 NT-proBNP 濃度が非常に広範囲に分布した原因は、HCM が心筋の肥大を始めた初期の症例から心不全の徴候を呈する前までの広い病期で無徴候であること、そして実際には心不全徴候が発現しているにもかかわらず、軽度であるために認知されていないことに起因する可能性がある。また、本章の結果より、各群の左房拡大の程度および心室肥大の程度は様々であり、血漿中 NT-proBNP 濃度はこれらの

変数と相関するため分布が広範囲になった可能性も考えられる。

第5章および第6章の結果を踏まえると、イヌおよびネコでそれぞれ好発する疾患の違いより、NT-proBNPの臨床的な利用法が異なると考えられた。すなわち、イヌでは粘液腫様変性に伴う僧帽弁閉鎖不全症に対するスクリーニング検査として、NT-proBNPは有用でなかった。それに対して、ネコではこれまで困難とされてきた無徴候のHCMに対しても高い感度および特異度をもって検出することが可能であった。この点において、NT-proBNPはイヌよりもネコで有用性が高いと考えられる。同一症例を追跡モニタする際の意義は本研究では検討しなかったが、イヌおよびネコの両方で左室および/または左房への容量負荷を示す変数と有意に相関したことから、心機能を反映するバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えられた。

本章での検討には2つの制限が存在する。血漿中NT-proBNP濃度は甲状腺機能亢進症のネコで上昇する[69]。ネコでは甲状腺機能亢進症の発症時年齢は95%の症例が10歳齢を上回っている[14, 85, 109]。そこで、本章での検討には、甲状腺機能亢進症を疑う臨床徴候を認めたネコ、そして10歳齢以上のネコを組み込まなかったが、それでも甲状腺機能亢進症のネコを完全に除外できなかった可能性は否定できない。第2に、心不全徴候の有無は問診所見、より正確には飼い主の判断にも基づいていた。このため、一部の症例では心不全徴候、特にネコでは問診による判定が難しい運動不耐性については、その判断が適切でなかった可能性がある。

## 5. 小括

本章では、HCMネコでの血漿中NT-proBNP濃度測定の臨床的意義を検討した。

その結果、HCMネコでは、血漿中NT-proBNP濃度はその心不全徴候の有無と関連して増加すること、その増加は心室肥大および心房拡張の程度と関連していること、そして無徴候HCMであっても信頼性をもって検出できることが明らかとなった。これまで、心エコー図検査を用いずに無徴候HCMのネコを検出することは不可能だったが、血漿中NT-proBNP濃度の測定により高い確率で検出可能となったことは特筆すべきことである。また血漿中

NT-proBNP 濃度は、何らかの理由により心エコー図検査が実施できない場合に左室肥大および左房拡張の程度を評価する方法の一つとして有用である可能性がある。

## 第 7 章

### 総括

本研究は、イヌおよびネコで心臓バイオマーカーの一種である N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP) の血漿濃度に影響を与える要因を検討し、それぞれイヌおよびネコで多発する僧帽弁閉鎖不全症 (MVI) および肥大型心筋症 (HCM) での血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を精査した。

第 1 章では、NT-proBNP の生合成、分泌および循環中からの排泄機序を要約した。続いて、心疾患に罹患したイヌおよびネコを対象にこれまでに報じられた血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を要約した。そして、同時に心臓バイオマーカーとしての価値に関して相反する結果が報じられており、この混乱を解消するためには血漿中 NT-proBNP 濃度の各種変動要因を解析する重要性を指摘した。

#### 1. イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の測定内変動および測定間変動の評価 (第 2 章)

血漿中 NT-proBNP 濃度を複数回測定し、測定値に変動が見られた場合、その変化が生体に由来するものか、測定変動に由来するかを鑑別する必要がある。しかし、この点に関する検討はこれまで十分に行われてこなかった。そこで、測定変動を測定内変動および測定間変動に分けて評価した。加えて、測定前のサンプルの処理法について、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)に加えてアプロチニンを添加する必要性の有無を検討した。本検討には、本学獣医内科学教室第二にて管理されていたイヌ 5 頭およびネコ 5 頭から採取した血液サンプルを用いた。

その結果、血漿中 NT-proBNP 濃度の測定内および測定間変動の変動係数 (CV) の中央値はイヌでは 11.4 および 19.9 %、ネコでは 10.6 および 16.9 % と、ヒトのそれら (それぞれ 1.6 または 2.7 % [68, 123]) よりも高値だったが、他の研究で報告されているイヌおよびネコの測定内変動 (それぞれ 13.2 および 9.1 %) とほぼ同等だった [21, 122]。またイヌおよびネコの血漿にそれぞれ EDTA のみを添加した場合、そして EDTA およびアプロチニンを添加した場合で血漿中 NT-proBNP 濃度を測定したところ、両者のサンプルで測定内および測定間変動に有意な影響は認められなかった。EDTA のみを添加したサンプルの方が CV が低値を示す傾向にあった。

以上の結果に基づき、本研究では血液サンプルに EDTA のみを添加することとした。また、血漿中 NT-proBNP 濃度を診断に活用する際には、約 20% の測定内変動を考慮する必要があることが解った。

## 2. 臨床的に健康なイヌおよびネコの NT-proBNP 濃度の日内および週間変動、そして食事および運動の影響の評価 (第 3 章)

心拍数および血圧には日内変動が存在する。これらの変動に応じて血漿中 NT-proBNP 濃度も変動する可能性があるが、この点は動物では全く検討されていない。加えて、動物は歩いてまたは走って動物病院を訪れ、採血されることが多い。また食物を摂取して来院することも少なくない。血漿中 NT-proBNP 濃度は運動および食物摂取に影響される可能性があるが、動物ではこれらの影響は評価されたことがなかった。そこで、臨床的に正常なイヌおよびネコを用いて血漿中 NT-proBNP 濃度の日内変動および週間変動を観察した。併せて臨床的に健康なイヌを用いて、食事および運動が血漿中 NT-proBNP 濃度および影響も評価した。本検討には本学獣医内科学教室第二で管理されていた臨床的に健康なイヌ 7 頭およびネコ 5 頭を用いた。

その結果、イヌおよびネコの両方で日内変動は認められなかった。加えて、食事および運動は血漿中 NT-proBNP 濃度に影響しないことも明らかになった。すなわち、血漿中 NT-proBNP 濃度の測定を目的として採血する場合、採血時刻、食物摂取および運動を考慮する必要がないと思われた。また、統計学的に有意ではなかったが、イヌで約 20 %、そしてネコでは約 35 % もの日内変動または週間変動が存在したことから、血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈する場合には、この程度の変動を考慮することが重要だと思われた。

## 3. 血漿中 NT-proBNP 濃度に対する糸球体ろ過量の影響の評価 (第 4 章)

循環中の NT-proBNP は腎臓のみから排泄されるため、血漿中 NT-proBNP 濃度は糸球体ろ過量 (GFR) の影響を強く受ける [39, 112]。実際に、ヒトでは腎機能の低下に伴って血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇する [1, 15, 26, 60, 65-67, 92, 114, 118]。これに対して、イヌおよびネコでは GFR および血漿中 NT-proBNP 濃度の関連は検討されていない。特に高齢なイヌおよびネコは慢

性腎臓病に罹患することも多いため、この関連性を明確にすることは血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を検討する上で重要な意味を持つと思われる。そこで、GFR が様々なイヌおよびネコを用いて血漿中 NT-proBNP 濃度と GFR の関連性を評価した。本検討には、本学付属動物医療センター腎臓科および一般開業動物病院 1 施設にて GFR を測定したイヌ 73 頭およびネコ 34 頭を用いた。

その結果、イヌでは血漿中 NT-proBNP 濃度は GFR の低下に伴って有意に上昇することが明らかとなった。これに対してネコでは、血漿中 NT-proBNP 濃度は GFR と有意に相関しなかったものの、GFR が中程度から重度に低下すると血漿中 NT-proBNP 濃度は有意に上昇した。

以上のことから、腎機能が低下したために血漿中 NT-proBNP 濃度が上昇した動物は心臓病と誤認される可能性がある、つまり偽陽性率が上昇すると考えられた。血漿中 NT-proBNP 濃度を測定する全ての動物で GFR を測定するのが最も理想的だが、臨床現場ではこの行為は非現実的だと思われる。このため、血清クレアチニン濃度(Cre)を併せて測定し、血漿中 NT-proBNP 濃度を解釈すべきだと考えられた。また、第 5 および 6 章では、Cre が参考範囲内である個体を検討対象にすることとした。

#### 4. 僧帽弁閉鎖不全症に罹患したイヌにおける血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義の検討 (第 5 章)

僧帽弁閉鎖不全症 (MVI) は特に中年期以降の小型犬で多発する代表的な心疾患である。これまでに、MVI での血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義として、心不全分類と密接に関連することなどが報じられている。MVI は三尖弁閉鎖不全症(TVI)または肺高血圧(PH)を合併することが多いが、これらの合併と血漿中 NT-proBNP 濃度の関連性はこれまでに検討されていない。そこで、本学付属動物医療センター循環器科を受診したイヌ 270 頭を対象に、この関連性を中心に検討した。

その結果、血漿中 NT-proBNP 濃度は心拡大に伴って上昇するものの、心臓が拡大していない早期 MVI に対するスクリーニング検査としては有用性が低いことが明らかとなった。しかし、血漿中 NT-proBNP 濃度は左房および左室

の容量負荷の増大と関連して増加することも明らかとなったことから、同一症例の左心系の容量負荷を経時的に追跡するパラメータとして有用な可能性があると思われた。また、血漿中 NT-proBNP 濃度は TVI または PH の合併に伴って有意に上昇した。International Small Animal Cardiac Health Council の心不全分類のステージ IIIa に限ると、TVI および PH の合併を検出する感度は 90.9 および 92.9% と高かったが、特異度は 62.5 および 40.0% と低いことも明らかになった。すなわち、TVI または PH の合併は血漿中 NT-proBNP 濃度に加えて他の検査結果を踏まえて総合的に判断する必要があると考えられた。

#### 5. 肥大型心筋症に罹患したネコにおける血漿中 NT-proBNP 濃度の臨床的意義の検討 (第 6 章)

肥大型心筋症(HCM)は最も代表的なネコの心疾患である。HCM はうっ血性心不全または動脈血栓塞栓症を呈することもあるが、無徴候の症例も多い。無徴候の症例では、身体検査で不整脈や心雑音といった異常所見を示さないことがある。HCM の確定診断には心エコー図検査が必須だが、このような異常所見を示さないネコでは心エコー図検査が実施されることはない。このため、心エコー図検査が必要な症例を検出するためのスクリーニング検査が必要である。また、イヌでは心エコー図検査変数と血漿中 NT-proBNP 濃度が密接に関連することが報告されているが、ネコはこのような検討は未だに実施されていない。そこで、これらの点を精査することでネコでの血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義を検討した。本検討には、本学付属動物医療センター循環器科に来院したネコ 95 頭を用いた。

その結果、血漿中 NT-proBNP 濃度は HCM による心不全徴候の有無と関連して有意に増加すること、その増加は心室肥大および心房拡張の程度と有意に相関すること、そして無徴候の HCM であっても十分な信頼性 (感度: 83.9、特異度: 93.9 %)をもって検出できることが明らかとなった。これまで、心エコー図検査を用いずに無徴候の HCM を検出することは不可能であったが、血漿中 NT-proBNP 濃度により高い確率で検出可能となったことは特筆すべきことである。また血漿中 NT-proBNP 濃度は心室肥大および心房拡張の指標となり、この濃度を参考に治療方針を策定できる可能性があると考えられた。

## 6. 本研究の結論と今後の展望

以上の結果に基づくと、イヌおよびネコでの血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義はいくつかの点で異なると考えられた。

MVI のイヌは心雑音の有無により容易に検出できるため、血漿中 NT-proBNP 濃度をこの目的で測定するメリットはないと思われる。PH の合併は血漿中 NT-proBNP 濃度により確認可能だが、特異度が低いことから、PH の合併は従来どおり心エコー図検査により評価すべきだと考えられた。

これに対して、ネコでは血漿中 NT-proBNP 濃度により、これまで不可能であった無徴候の HCM を高い信頼性をもって検出できることが明らかとなった。このため、特に好発品種のネコ、交配を予定しているネコ、より完全な健康診断を必要とするネコのスクリーニング検査に血漿中 NT-proBNP 濃度を組み込むことは極めて有益だと考えられた。また、HCM のネコでは血漿中 NT-proBNP 濃度を心室肥大および心房拡張の指標にして治療を進めることが可能だと思われた。

血漿中 NT-proBNP 濃度には日内変動は存在せず、また食事や運動の影響を受けないことが解った。これらの知見はこの心臓バイオマーカーの測定を目的に採血する際に有益な情報である。さらに、血漿中 NT-proBNP 濃度は GFR の影響も受けるため、この濃度を診療でより適切に活用するためには、腎機能を併せて評価する必要があることを本研究は明らかにした。

本研究では、心機能の改善または悪化に伴って血漿中 NT-proBNP 濃度がどのように変動するかを検討しなかった。この点を明らかにすることで、血漿中 NT-proBNP 濃度が心不全動物の予後の指標となる可能性が期待される。加えて、本研究では血漿中 NT-proBNP 濃度が GFR の影響を強く受けることを解明したが、この濃度に影響する要因を全て明らかにした訳ではない。MVI および慢性腎臓病と同様、老齢なイヌで多く発生する副腎皮質機能亢進症では高血圧や肺血栓塞栓症を合併することが多い。また、老齢なネコで多発する甲状腺機能亢進症でも高血圧を頻繁に合併する。これらの疾患に続発した高血圧に対する心肥大の有無や程度を血漿中 NT-proBNP 濃度で判断できる可能性がある。これらの点を明らかにすることで、イヌおよびネコの血漿中 NT-proBNP 濃度の診断的意義がより確固たるものになることを期待したい。

## 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頂きました、本学獣医内科学教室第二 竹村 直行教授、宮川 優一助教に甚大なる謝意を表します。本研究において数多くのサンプルの測定を実施していただきました IDEXX LABORATORIES 株式会社 山崎 浩介様、音川 剛潔様に深謝致します。

本研究を行うに際してご尽力をいただきました本学獣医内科学教室第二 卒業生の志賀壮一郎先生、矢部摩耶先生、大北真希先生、北村鮎美先生、定月英理子先生、高田奈菜子先生、藤掛浩平先生、市田旭宏先生、尾形真祐先生、二階綾香先生、松村尚美先生、獣医内科学教室第二研究生の斉藤るみ先生、住吉義和先生、高橋真理先生、徳力 剛先生、戸田典子先生、仲間千夏先生、三原貴洋先生、同教室室員の増田杏奈さん、増田堯之さん、三河翔馬さん、三根薫子さん、上地亜樹さん、福永拓郎さん、明石唯也さん、赤羽根僚太さん、阿部麗さん、上月 遥さん、酒谷 篤さん、椎木夏子さん、坪松若奈さん、石関花衣さん、七條紗季さん、酒井雄介さん、谷 康平さん、寺門秀明さん、中西隼一さん、目澤咲綾さん、本学動物医療センターの助手および研修医の先生方に厚く御礼を申し上げます。

本大学および大学院に入学以来、生活面、学費面そして精神面で多大な迷惑をかけたにもかかわらず、支えて下さった両親、兄弟に心から感謝致します。

最後に、本研究に供試された実験動物、また本研究に多大なご協力を頂いた心疾患を患った多くの動物達に深く感謝すると共に、多くの動物の健康を願い、この研究の成果、今後なされていく多くの研究の成果が、将来動物を病気という苦しみから救うために役立つことを切に願います。

## 参考文献

1. Anwaruddin S, Lloyd-Jones DM, Baggish A, Chen A, Krauser D, Tung R, Chae C, Januzzi JL Jr. Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement: results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 91-7.
2. Arteaga E, Araujo AQ, Buck P, Ianni BM, Rabello R, Mady C. Plasma amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide quantification in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2005; 150: 1228-32.
3. Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, Gorelick JJ, Durham HE. Evaluation of pimobendan and N-terminal probrain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2009; 23: 1190-6.
4. Austin WJ, Bhalla V, Hernandez-Arce I, Isakson SR, Beede J, Clopton P, Maisel AS, Fitzgerald RL. Correlation and prognostic utility of B-type natriuretic peptide and its amino-terminal fragment in patients with chronic kidney disease. *Am J Clin Pathol.* 2006; 126: 506-12.
5. Balion CM, Santaguida P, McKelvie R, Hill SA, McQueen MJ, Worster A, Raina PS. Physiological, pathological, pharmacological, biochemical and hematological factors affecting BNP and NT-proBNP. *Clin Biochem.* 2008; 41: 231-9.
6. Barnes SC, Collinson PO, Galasko G, Lahiri A, Senior R. Evaluation of N-terminal pro-B type natriuretic peptide analysis on the Elecsys 1010 and 2010 analysers. *Ann Clin Biochem.* 2004; 41: 459-63.
7. Barst RJ, Gibbs JS, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Rubin LJ, Sitbon O, Tapson VF, Galiè N. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: S78-84.
8. Beilby J. National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) laboratory medicine guidelines on the clinical utilization and analytical issues for cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29: 107-11.
9. Biondo AW, Ehrhart EJ, Sisson DD, Bulmer BJ, De Morais HS, Solter PF.

- Immunohistochemistry of Atrial and Brain Natriuretic Peptides in Control Cats and Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Vet Pathol.* 2003; 40: 501-516.
10. Bonagura JD. Feline echocardiography. *J Fel Med Surg* 2000; 2: 147-51.
  11. Borgarelli M, Haggstrom J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010; 40: 651-63.
  12. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J, Tarducci A. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med.* 2008; 22: 120-8.
  13. Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract.* 2008; 49: 26-32.
  14. Broussard JD, Peterson ME, Fox PR. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 206: 302-5.
  15. Bruch C, Reinecke H, Stypmann J, Rothenburger M, Schmid C, Breithardt G, Wichter T, Gradaus R. N-terminal pro-brain natriuretic peptide, kidney disease and outcome in patients with chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant.* 2006; 25: 1135-41.
  16. Bruins S, Fokkema MR, Römer JW, Dejongste MJ, van der Dijs FP, van den Ouweland JM, Muskiet FA. High intraindividual variation of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. *Clin Chem.* 2004; 50: 2052-8.
  17. Buchanan JW. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. *Adv Vet Sci Comp Med.* 1977; 21: 75-106.
  18. Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM, Yandle TG, Protter A, Kosoglou T. Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1996; 271: 373-80.

19. Chetboul V, Serres F, Tissier R, Lefebvre HP, Sampedrano CC, Gouni V, Poujol L, Hawa G, Pouchelon J-. Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2009; 23: 984-94.
20. Chiavegato D, Borgarelli M, D'Agnolo G, Santilli RA. Pulmonary hypertension in dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Vet Radiol Ultrasound.* 2009; 50: 253-8.
21. Collins SA, Patteson MW, Connolly DJ, Brodbelt DC, Torrance AG, Harris JD. Effects of sample handling on serum N-terminal proB-type natriuretic peptide concentration in normal dogs and dogs with heart disease. *J Vet Cardiol.* 2010; 12: 41-8.
22. Connolly DJ, Magalhaes RJ, Syme HM, Boswood A, Fuentes VL, Chu L, Metcalf M. Circulating natriuretic peptides in cats with heart disease. *J Vet Intern Med.* 2008; 22: 96-105.
23. Connolly DJ, Soares Magalhaes RJ, Fuentes VL, Boswood A, Cole G, Boag A, Syme HM. Assessment of the diagnostic accuracy of circulating natriuretic peptide concentrations to distinguish between cats with cardiac and non-cardiac causes of respiratory distress. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S41-S50.
24. Davenport DJ, Mostardi RA, Richardson DC, Gross KL, Greene KA, Blair K. Protein-deficient diet alters serum alkaline phosphatase, bile acids, proteins and urea nitrogen in dogs. *J Nutr.* 1994; 124: S2677-79.
25. De Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet.* 2003; 362: 316-22.
26. DeFilippi CR, Seliger SL, Maynard S, Christenson RH. Impact of renal disease on natriuretic peptide testing for diagnosing decompensated heart failure and predicting mortality. *Clin Chem.* 2007; 53: 1511-9.
27. DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, Hansen BD, Keene BW, Moore DT, Atkins CE. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or

- dyspnea. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 243-50.
28. Dentali F, Donadini M, Gianni M, Bertolini A, Lonn E, Venco A, Cattozzo G, Ageno W. Brain natriuretic peptide as a preclinical marker of chronic pulmonary hypertension in patients with pulmonary embolism. *Intern Emerg Med.* 2009;4:123-8.
  29. Di Serio F, Ruggieri V, Varraso L, De Sario R, Mastroianni A, Pansini N. Analytical evaluation of the Dade Behring Dimension RxL automated N-Terminal proBNP (NT-proBNP) method and comparison with the Roche Elecsys 2010. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43: 1263-73.
  30. Feeman WE 3rd, Couto CG, Gray TL. Serum creatinine concentrations in retired racing Greyhounds. *Vet Clin Pathol.* 2003; 32: 40-2.
  31. Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, O'Connor CM. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J.* 2009; 158: 422-430.
  32. Ferasin L, Sturgess CP, Cannon MJ, Caney SM, Gruffydd-Jones TJ, Wotton PR. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *J Feline Med Surg.* 2003; 5: 151-9.
  33. Finco DR, Braselton WE, Cooper TA. Relationship between plasma iohexol clearance and urinary exogenous creatinine clearance in dogs. *J Vet Intern Med.* 2001; 15: 368-73.
  34. Fine DM, DeClue AE, Reiner CR. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2008; 232: 1674-9.
  35. Fox PR, Oyama MA, Reynolds C, Rush JE, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Macdonald KA, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kellihan HB, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Lefbom BK, Moise NS, Hogan DF. Utility of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) to distinguish between congestive heart failure and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S51-61.

36. Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: The endocrine heart revisited. *Clin. Chem.* 2004; 50: 150-1.
37. Haendchen RV, Povzhitkov M, Meerbaum S, Maurer G, Corday E. Evaluation of changes in left ventricular end-diastolic pressure by left atrial two-dimensional echocardiography. *Am Heart J.* 1982; 104: 740-5.
38. Häggström J, Boswood A, O'Grady M, Jöns O, Smith S, Swift S, Borgarelli M, Gavaghan B, Kresken JG, Patteson M, Ablad B, Bussadori CM, Glaus T, Kovacević A, Rapp M, Santilli RA, Tidholm A, Eriksson A, Belanger MC, Deinert M, Little CJ, Kwart C, French A, Rønn-Landbo M, Wess G, Eggertsdottir AV, O'Sullivan ML, Schneider M, Lombard CW, Dukes-McEwan J, Willis R, Louvet A, DiFruscia R. Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *J Vet Intern Med.* 2008; 22: 1124-35.
39. Hall C. NT-proBNP: the mechanism behind the marker. *J Card Fail.* 2005; 11: S81-3.
40. Han RI, Black A, Culshaw GJ, French AT, Else RW, Corcoran BM. Distribution of myofibroblasts, smooth muscle-like cells, macrophages, and mast cells in mitral valve leaflets of dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res.* 2008; 69: 763-9.
41. Hasegawa K, Fujiwara H, Doyama K, Miyamae M, Fujiwara T, Suga S, Mukoyama M, Nakao K, Imura H, Sasayama S. Ventricular expression of brain natriuretic peptide in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 1993; 88: 372-80.
42. Heidenreich PA, Gubens MA, Fonarow GC, Konstam MA, Stevenson LW, Shekelle PG. Cost-effectiveness of screening with B-type natriuretic peptide to identify patients with reduced left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 1019-26.
43. Hori Y, Sano N, Kanai K, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S. 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.* 2010; 185: 317-21.

44. Hori Y, Uchide T, Saitoh R, Thoei D, Uchida M, Yoshioka K, Chikazawa S, Hoshi F. Diagnostic utility of NT-proBNP and ANP in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Vet J.* 2012; 194: 215-21.
45. Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38: 789-95.
46. Hsu A, Kittleson MD, Paling A. Investigation into the use of plasma NT-proBNP concentration to screen for feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S63-70.
47. [http://www.idexx.co.jp/html/ja\\_jp/smallanimal/reference-laboratories/testmenu/innovative-tests/cardiopet-probnp.html](http://www.idexx.co.jp/html/ja_jp/smallanimal/reference-laboratories/testmenu/innovative-tests/cardiopet-probnp.html)
48. International Small Animal Cardiac Health Council. Recommendations for diagnosis of heart disease and treatment of heart failure in small animals. In: Fox, P. R., Sisson, D. and Moise N. S. eds. *Textbook of Canine and Feline Cardiology*, 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 1999: 883 - 901.
49. Johnson L. Diagnosis of pulmonary hypertension. *Clin Tech Small Anim Pract.* 1999; 14: 231-6.
50. Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juillière Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 1733-9.
51. Kellihan HB, Mackie BA, Stepien RL. NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* 2011; 13: 171-82.
52. Kellihan HB, Oyama MA, Reynolds CA, Stepien RL. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S93-7.
53. Kellum HB, Stepien RL. Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 1258-64.
54. Khan IA, Fink J, Nass C, Chen H, Christenson R, deFilippi CR. N-terminal

- pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide for identifying coronary artery disease and left ventricular hypertrophy in ambulatory chronic kidney disease patients. *Am J Cardiol.* 2006; 97: 1530-4.
55. Kim SW, Park SW, Lim SH, Kwon SU, Choi YJ, Park MK, Lee SC, Lee SH, Park JE, Jeon ES. Amount of left ventricular hypertrophy determines the plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide level in patients with hypertrophic cardiomyopathy and normal left ventricular ejection fraction. *Clin Cardiol.* 2006; 29: 155-60.
56. Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Murakawa K, Yasunari K, Akioka K, Tahara A, Toda I, Takeuchi K, Kurihara N, Takeda T. Brain natriuretic peptide as a cardiac hormone in essential hypertension. *Am J Med.* 1992; 92: 29-34.
57. Kwart C, Häggström J, Pedersen HD, Hansson K, Eriksson A, Järvinen AK, Tidholm A, Bsenko K, Ahlgren E, Ilves M, Ablad B, Falk T, Bjerkfås E, Gundler S, Lord P, Wegeland G, Adolfsson E, Corfitzen J. Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. *J Vet Intern Med.* 2002; 16: 80-8.
58. Lalor SM, Connolly DJ, Elliott J, Syme HM. Plasma concentrations of natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S71-9.
59. Leuchte HH, El Nounou M, Tuerpe JC, Hartmann B, Baumgartner RA, Vogeser M, Muehling O, Behr J. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest.* 2007; 131: 402-9.
60. Luchner A, Hengstenberg C, Löwel H, Riegger GA, Schunkert H, Holmer S. Effect of compensated renal dysfunction on approved heart failure markers: direct comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP. *Hypertension.* 2005; 46: 118-23.
61. MacDonald K. Myocardial disease: Feline. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 7th ed. Missouri, Saunders Elsevier Inc. 2010: 1328-1341.

62. MacLean HN, Abbott JA, Ward DL, Huckle WR, Sisson DD, Pyle RL. N-terminal atrial natriuretic peptide immunoreactivity in plasma of cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med.* 2006; 20: 284-9.
63. Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide--where are we now? *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46: 1507-14.
64. Marino CL, Cober RE, Iazbik MC, Couto CG. White-coat effect on systemic blood pressure in retired racing Greyhounds. *J Vet Intern Med.* 2011; 25: 861-5.
65. McCullough PA, Duc P, Omland T, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Storrow AB, Abraham WT, Lamba S, Wu AH, Perez A, Clopton P, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Maisel AS; Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis.* 2003; 41: 571-9.
66. McCullough PA, Kuncheria J, Mathur VS. Diagnostic and therapeutic utility of B-type natriuretic peptide in patients with renal insufficiency and decompensated heart failure. *Rev Cardiovasc Med.* 2003; 4: S3-12.
67. McCullough PA, Sandberg KR. B-type natriuretic peptide and renal disease. *Heart Fail Rev.* 2003; 8: 355-8.
68. Melzi d'Eril G, Tagnochetti T, Nauti A, Klersy C, Papalia A, Vadacca G, Moratti R, Merlini G. Biological variation of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy individuals. *Clin Chem.* 2003; 49: 1554-5.
69. Menaut P, Connolly DJ, Volk A, Pace C, Luis Fuentes V, Elliott J, Syme H. Circulating natriuretic peptide concentrations in hyperthyroid cats. *Small Anim Pract.* 2012; 53: 673-8.
70. Meurs KM. Myocardial disease: Canine. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 7th ed. Missouri, Saunders Elsevier Inc. 2010: 1320-328.
71. Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H. Evaluation of a single sampling method for estimation of plasma iohexol clearance in dogs and cats with various kidney functions. *J Vet Med Sci.* 2010; 72: 271-8.

72. Miyagawa Y, Tominaga Y, Toda N, Takemura N. Relationship between glomerular filtration rate and plasma N-terminal pro B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with chronic kidney disease. *Vet J.* 2013; 197: 445-50.
73. Miyamoto K. Use of plasma clearance of iohexol for estimating glomerular filtration rate in cats. *Am J Vet Res.* 2001; 62: 572-5.
74. Moonarmart W, Boswood A, Luis Fuentes V, Brodbelt D, Souttar K, Elliott J. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *J Small Anim Pract.* 2010; 51: 84-96.
75. Morello AM, Januzzi JL. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide: a biomarker for diagnosis, prognosis and management of heart failure. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006; 6: 649-62.
76. Morrison LK, Harrison A, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Maisel A. Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 202-9.
77. Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 942-4.
78. Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Kuribayashi S, Hamada S, Kakishita M, Nakanishi N, Takamiya M, Kunieda T, Matsuo H, Kangawa K. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31: 202-8.
79. Nakagawa K, Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H. Effect of diet on the cardiovascular system in healthy beagles. *J Vet Med Sci.* 2010; 72: 615-9.
80. O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, Phelan D, Cunningham S, McDonald K. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J*

- Card Fail. 2007; 13: 50-5.
81. Olsen LH, Häggström J, Petersen HD. Acquired valvular heart disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7th ed. Missouri, Saunders Elsevier Inc.2010: 1299-1319.
  82. Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. 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.* 2008; 232: 1496-503.
  83. Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, Fox PR, Reynolds CA, Gordon SG, Bulmer BJ, Lefbom BK, Brown BA, Lehmkuhl LB, Prosek R, Lesser MB, Kraus MS, Bossbaly MJ, Rapoport GS, Boileau JS. 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.* 2009; 235: 1319-25.
  84. Ozmen B, Ozmen D, Parildar Z, Mutaf I, Bayindir O. Serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) levels in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Res.* 2007; 32: 1-8.
  85. Peterson ME, Kintzer PP, Cavanagh PG, Fox PR, Ferguson DC, Johnson GF, Becker DV. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1983; 183: 103-10.
  86. Pizarro R, Bazzino OO, Oberti PF, Falconi M, Achilli F, Arias A, Krauss JG, Cagide AM. Prospective validation of the prognostic usefulness of brain natriuretic peptide in asymptomatic patients with chronic severe mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: 1099-106.
  87. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 191: 341-66.
  88. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med.* 2007; 21:

238-42.

89. Raffan E, Loureiro J, Dukes-McEwan J, Fonfara S, James R, Swift S, Bexfield N, Herrtage ME, Archer J. The cardiac biomarker NT-proBNP is increased in dogs with azotemia. *J Vet Intern Med.* 2009; 23: 1184-9.
90. Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Trawinski J, Pedersen F. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. *Heart.* 2003; 89: 745-51.
91. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 976-82.
92. Richards M, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, Frampton CM, Crozier IG, Yandle TG, Doughty R, MacMahon S, Sharpe N; Christchurch Cardioendocrine Research Group; Australia-New Zealand Heart Failure Group. Comparison of B-type natriuretic peptides for assessment of cardiac function and prognosis in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 52-60.
93. Riesen SC, Kovacevic A, Lombard CW, Amberger C. Prevalence of heart disease in symptomatic cats: an overview from 1998 to 2005. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2007; 149: 65-71.
94. Rishniw M, Thomas WP. Dynamic right ventricular outflow obstruction: a new cause of systolic murmurs in cats. *J Vet Intern Med.* 2002; 16: 547-52.
95. Ruskoaho H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev.* 2003; 24: 341-56.
96. Schmidt MK, Reynolds CA, Estrada AH, Prosek R, Maisenbacher HW, Sleeper MM, Oyama MA. Effect of azotemia on serum N-terminal proBNP concentration in dogs with normal cardiac function: a pilot study. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S81-6.
97. Schumann C, Lepper PM, Frank H, Schneiderbauer R, Wibmer T, Kropf C, Stoiber KM, Rüdiger S, Kruska L, Krahn T, Kramer F. Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension. *Biomarkers.* 2010; 15: 523-32.

98. Serfass P, Chetboul V, Sampedrano CC, Nicolle A, Benalloul T, Laforge H, Gau C, Hébert C, Pouchelon JL, Tissier R. Retrospective study of 942 small-sized dogs: Prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breed and sex. *J Vet Cardiol.* 2006; 8: 11-8.
99. Serres FJ, Chetboul V, Tissier R, Carlos Sampedrano C, Gouni V, Nicolle AP, Pouchelon JL. Doppler echocardiography-derived evidence of pulmonary arterial hypertension in dogs with degenerative mitral valve disease: 86 cases (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2006; 229: 1772-8.
100. Shah KB, Nolan MM, Rao K, Wang DJ, Christenson RH, Shanholtz CB, Mehra MR, Gottlieb SS. The characteristics and prognostic importance of NT-ProBNP concentrations in critically ill patients. *Am J Med.* 2007; 120: 1071-7.
101. Singletary GE, Rush JE, Fox PR, Stepien RL, Oyama MA. Effect of NT-pro-BNP assay on accuracy and confidence of general practitioners in diagnosing heart failure or respiratory disease in cats with respiratory signs. *J Vet Intern Med.* 2012; 26: 542-6.
102. Stepien RL. Pulmonary arterial hypertension secondary to chronic left-sided cardiac dysfunction in dogs. *J Small Anim Pract.* 2009; 50: 34-43.
103. Takemura N, Koyama H, Sako T, Ando K, Suzuki K, Motoyoshi S, Marumo F. Pharmacokinetics of human alpha-atrial natriuretic peptide (alpha-hANP) in cow and dog. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1990; 52: 165-6.
104. Takemura N, Toda N, Miyagawa Y, Asano K, Tejima K, Kanno N, Arisawa K, Kurita T, Nunokawa K, Hirakawa A, Tanaka S, Hirose H. Evaluation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) concentrations in dogs with mitral valve insufficiency. *J Vet Med Sci.* 2009; 71: 925-9.
105. Tang WH, Francis GS, Morrow DA, Newby LK, Cannon CP, Jesse RL, Storrow AB, Christenson RH, Apple FS, Ravkilde J, Wu AH; National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation.* 2007; 116: 99-109.
106. Tang WH, Francis GS, Morrow DA, Newby LK, Cannon CP, Jesse RL, Storrow AB,

- Christenson RH; NACB Committee. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin Biochem.* 2008; 41: 210-21.
107. Tarnow I, Olsen LH, Kwart C, Hoglund K, Moesgaard SG, Kamstrup TS, Pedersen HD, Häggström J. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J.* 2009; 180: 195-201.
108. Taylor JA, Christenson RH, Rao K, Jorge M, Gottlieb SS. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures. *Am Heart J.* 2006; 152: 1071-6.
109. Thoday KL, Mooney CT. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *Vet Rec.* 1992; 131: 257-64.
110. Thomas CJ, Woods RL. Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30: 369-75.
111. Tominaga Y, Miyagawa Y, Toda N, Takemura N. The diagnostic significance of the plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration in asymptomatic cats with cardiac enlargement. *J Vet Med Sci.* 2011; 73: 971-5.
112. Tsutamoto T, Sakai H, Ishikawa C, Fujii M, Tanaka T, Yamamoto T, Takashima H, Ohnishi M, Wada A, Horie M. Direct comparison of transcardiac difference between brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2007; 9: 667-73.
113. Van Kimmenade R, van Dielen F, Bakker J, Nijhuis J, Crijns H, Buurman W, van Dieijen-Visser M, Greve JW, Pinto Y. Is brain natriuretic peptide production decreased in obese subjects? *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 886-7
114. Van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Baggish AL, Lainchbury JG, Bayes-Genis A, Richards AM, Pinto YM. Amino-terminal pro-brain natriuretic Peptide, renal function, and outcomes in acute heart failure: redefining the cardiorenal interaction? *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 1621-7.
115. Van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr. The evolution of the natriuretic peptides -

- Current applications in human and animal medicine. *J Vet Cardiol.* 2009; 11: S9-21.
116. Van Kimmenade RR, Pinto YM, Januzzi JL Jr. Importance and interpretation of intermediate (gray zone) amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations. *Am J Cardiol.* 2008; 101: 39-42.
117. Vanderheyden M, Vrints C, Verstreken S, Bartunek J, Beunk J, Goethals M. B-type natriuretic peptide as a marker of heart failure: new insights from biochemistry and clinical implications. *Biomark Med.* 2010; 4: 315-20.
118. Vickery S, Price CP, John RI, Abbas NA, Webb MC, Kempson ME, Lamb EJ. B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy. *Am J Kidney Dis.* 2005; 46: 610-20.
119. Ware WA. Clinical manifestations of cardiac disease. In: Nelson RW, Couto CG, eds. *Small animal internal medicine.* 4th ed. Missouri, Mosby Elsevier Inc. 2009: 1-11.
120. Weber M, Burian M, Dragutinovic I, Moellmann H, Nef H, Elsaesser A, Mitrovic V, Hamm C, Geisslinger G. Genetic polymorphism of the type A human natriuretic peptide receptor (NPR-A) gene contributes to the interindividual variability in the BNP system. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10: 482-9.
121. Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Am J Vet Res.* 2011; 72: 642-9.
122. Wess G, Daisenberger P, Mahling M, Hirschberger J, Hartmann K. Utility of measuring plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in detecting hypertrophic cardiomyopathy and differentiating grades of severity in cats. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40: 237-44.
123. Wu AH, Smith A, Wiczorek S, Mather JF, Duncan B, White CM, McGill C, Katten D, Heller G. Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 2003; 92: 628-31.
124. Wu AH. Serial testing of B-type natriuretic peptide and NTpro-BNP for

monitoring therapy of heart failure: the role of biologic variation in the interpretation of results. *Am Heart J.* 2006; 152: 828-34.

125. Zimmering TM, Meneses F, Nolte IJ, Simon D. Measurement of N-terminal proatrial natriuretic peptide in plasma of cats with and without cardiomyopathy. *Am J Vet Res.* 2009; 70: 216-22.

The diagnostic significance of plasma N-terminal pro-B type natriuretic peptide concentration in dogs and cats with cardiac diseases

## Summary

Cardiac diseases in dogs and cats are one of the most common disorder in clinical settings. Mitral valve insufficiency (MVI) in dogs and hypertrophic cardiomyopathy (HCM) in cats are the most common. These diseases can lead to congestive heart failure (CHF) with poor prognosis.

History-taking, physical examination, electrocardiogram, thoracic radiography and echocardiography are usually performed as diagnostic examinations for dogs and cats with cardiac diseases. N-terminal pro B type natriuretic peptide (NT-proBNP) used as cardiac biomarker in human medicine is also available in dogs and cats, and contradicting results for its diagnostic significance have been reported in these species to date. One cause of such controversy might result from the unknown factors affecting plasma NT-proBNP concentration in dogs and cats. Therefore, the purposes of the present study were to investigate various factors affecting plasma NT-proBNP concentration, and to establish the diagnostic significance of plasma NT-proBNP concentration for evaluating MVI in dogs and HCM in cats.

### 1. Intra- and inter-assay variations in canine and feline plasma NT-proBNP concentration (Chapter 2)

Intra- and inter-assay variations are significant to determine whether the variation of plasma NT-proBNP concentration resulted from hemodynamics or measurement procedure when there were variations in plasma NT-proBNP concentration in same case. In addition, necessity to add aprotinin to the plasma were also determined.

The plasma obtained from 5 dogs and 5 cats were used. In the evaluation of intra-assay variation, the plasma added to ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) was divided into 10 tubes, and the plasma NT-proBNP concentrations were simultaneously measured. In the evaluation of inter-assay variation, plasma NT-proBNP concentrations were measured 10 times at interval over 1 day. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variance (CV) were calculated. Then, the plasma NT-proBNP concentration was measured using the plasma added to EDTA and aprotinin, and the concentrations were compared with the concentrations measured using the plasma added EDTA.

The medians of CV indicating intra- and inter-assay variations in plasma NT-proBNP concentrations were 11.4 and 19.9% in dogs, and 10.6 and 16.9% in cats. These variations were larger in those in humans, however comparable to those from dogs and cats by another reports. Inter- and intra- assay variations were similar between sample added to EDTA and sample added to EDTA and aprotinin. There was the tendency that plasma NT-proBNP concentration was less variable in the sample added to EDTA.

Based on these results, it was decided that the canine and feline plasma added to EDTA were used in further research in the present study. Variation of about 20% in plasma NT-proBNP concentration due to measurement procedure was confirmed in this chapter.

## 2. Daily and weekly variations of, and effects of dietary intake and walking on plasma NT-proBNP concentration in clinically healthy dogs and cats (Chapter 3)

Existence and absence of daily and weekly variations in plasma NT-proBNP concentration were determined using clinically healthy dogs

(n=7) and cats (n=5), and effects of dietary intake and 15 minutes walking were observed only in clinically healthy dogs (n=7).

The plasma were obtained every 3 hours, and significance of daily variation was determined by plasma NT-proBNP concentration at each time. The degree of daily variation was determined by CV. The plasma were obtained every week, and the presence and the degree of weekly variation were analyzed. In the evaluations of effects of diet intake or walking, the plasma was obtained before diet intake or walking, and 5, 15, 30, 60, 90 120 and 180 minutes after diet intake or walking. The dogs were made to walk for 15 minutes at the speed similar to human walking.

Although there were insignificant daily variations in both species, daily or weekly variation of about 20% in dogs and 35% in cats were confirmed. In addition, dietary intake and walking did not affect plasma NT-proBNP concentration.

Based on these results, it was concluded that the time for sampling and dietary intake and walking were not required to consider for the measurement of canine and feline plasma NT-proBNP concentrations. However, it was advised that the intra-individual variation of 20-35% should be considered when plasma NT-proBNP concentration was interpreted in clinical setting.

### 3. Effect of glomerular filtration rate on plasma NT-proBNP concentration in dogs and cats (Chapter 4)

Because circulating NT-proBNP is excreted only from the kidney, plasma NT-proBNP concentration may be affect by glomerular filtration rate (GFR). However, association of the concentration and GFR were not investigated in dogs and cats to date. Thus, the effect of GFR on plasma NT-proBNP concentration was investigated using 73 dogs and 34 cats with various GFR

and without cardiac disease, which were presented to the cardiology service in the Animal Medical Center, Nippon Veterinary and Animal Science University.

As the results, plasma NT-proBNP concentration significantly and inversely correlated with GFR in dogs but not in cats. Plasma NT-proBNP concentration significantly increased in cats with moderate to severely reduced GFR. In some animal, plasma NT-proBNP concentration exceeded cutoff value for detection of animals with possible cardiac disease.

These results indicated that GFR should be considered when plasma NT-proBNP concentration was used as cardiac biomarker. However, it was impractical that measurement of GFR in all clinical cases, and thus, plasma NT-proBNP concentration should be interpreted with simultaneous plasma creatinine concentration

#### 4. The diagnostic significance of plasma NT-proBNP concentration in dogs with MVI (Chapter 5)

In this chapter, the diagnostic significance of plasma NT-proBNP concentration in dogs with MVI, dogs with MVI and tricuspid valve insufficiency (TVI), and dogs with MVI, TVI and pulmonary hypertension (PH) secondary to MVI were investigated. In this study, 270 dogs presented to the cardiology service in Animal Medical Center, Nippon Veterinary and Animal Science University were used.

In dogs with MVI, plasma NT-proBNP concentration increased in association with cardiac enlargement due to MVI. However, plasma NT-proBNP concentration in dogs without cardiac enlargement, indicating the concentration was less significance as screening test in such dogs. Since plasma NT-proBNP concentration elevated in association with increases in volume overload of the left atrium and ventricle, the

concentration might be useful for continuous monitoring for left-heart volume overload. In addition, plasma NT-proBNP concentration was significantly higher in dogs with MVI, TVI and secondary PH than that in dogs with MVI alone. In dogs classified as International Small Animal Cardiac Health Council stage IIIa, plasma NT-proBNP concentration was found to be sensitive and less specific to detect complication of TVI and PH secondary to MVI. Echocardiography would be essential to confirm the existence of TVI and PH.

#### 5. The diagnostic significance of plasma NT-proBNP concentration in cats with HCM (Chapter 6)

In this chapter, the diagnostic significance of plasma NT-proBNP concentration, and the association with the concentration and several echocardiographic variables were investigated using 95 cats presented to the cardiology service in the Animal Medical Center, Nippon Veterinary and Life Science University. Result in this chapter indicated that plasma NT-proBNP concentration increased in association with existence of CHF, left ventricular hypertrophy and left atrial dilation. It was also confirmed that plasma NT-proBNP concentration could detect even cats with asymptomatic HCM with reliable sensitivity (83.9%) and specificity (93.9%). It was noteworthy that cats with asymptomatic HCM could be detected using plasma NT-proBNP concentration, because such cats could not be detected by using clinical examination other than echocardiography. Moreover, plasma NT-proBNP concentration might be valuable to follow the degree of ventricular hypertrophy and atrial distention in same cat.

In conclusion, it was considered that the diagnostic value of plasma NT-proBNP concentration was more significant in cat with HCM than in

dogs with MVI. Plasma NT-proBNP concentration failed to detect dogs with mild MVI without cardiac enlargement and dogs with complication of TVI and PH. In contrast, clinical value of plasma NT-proBNP concentration was more significant in cats with HCM. Especially, it would be most important finding in the present study that plasma NT-proBNP concentration could detect cats having asymptomatic HCM with acceptable sensitivity and specificity. Cats with HCM suddenly developed CHF and/or arterial thromboembolism, and HCM was found to be inheritance disease in some feline breeds. Including plasma NT-proBNP concentration in feline screening health examination might be helpful in early detection and therapeutic intervention for HCM.