

犬の心不全におけるミルリノン、カルペリチド、イマチニブ  
およびプラバスタチンの治療効果

山口大学大学院連合獣医学研究科

有田 申二  
2014年3月

# 目次

|  | ページ |
|--|-----|
| 序論                                       | 1   |
| <br>                                     |     |
| 第1章                                      | 4   |
| 重症心不全犬におけるミルリノンとカルペリチドの<br>低用量併用療法の効果    |     |
| 緒言                                       | 5   |
| 材料および方法                                  | 6   |
| 結果                                       | 9   |
| 考察                                       | 15  |
| <br>                                     |     |
| 第2章                                      | 18  |
| 犬の肺高血圧症に対する低用量イマチニブの治療効果                 |     |
| 緒言                                       | 19  |
| 材料および方法                                  | 21  |
| 結果                                       | 27  |
| 考察                                       | 34  |
| <br>                                     |     |
| 第3章                                      | 38  |
| 健康犬におけるプラバスタチンの心エコーと血行力学的<br>パラメータに及ぼす影響 |     |
| 緒言                                       | 39  |
| 材料および方法                                  | 40  |
| 結果                                       | 45  |
| 考察                                       | 55  |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 第4章                      | 60 |
| 犬の僧帽弁閉鎖不全症に対するプラバスタチンの効果 |    |
| 緒言                       | 61 |
| 材料および方法                  | 62 |
| 結果                       | 66 |
| 考察                       | 71 |
| <br>                     |    |
| 結論                       | 74 |
| <br>                     |    |
| 要約                       | 77 |
| <br>                     |    |
| 謝辞                       | 80 |
| <br>                     |    |
| 引用文献                     | 81 |

## 序論

急性心不全は、急性肺水腫や僧帽弁閉鎖不全症(MR)などによる慢性心不全の急性増悪などにより起こり、左心不全では肺うっ血が主体で、右心不全は全身静脈がうっ血した状態である。どちらの心不全も心拍出量(CO)低下を伴うことが多い。獣医領域では薬物による急性心不全の治療が主体であり、血管拡張薬、利尿薬、カテコラミン製剤を中心として使用されている。また、軽症例および初発症例ではこれらの薬剤に奏効することが多いが、重症例や急性心不全再発例では反応が低いことがある。その原因として薬剤耐性[1,2]、不整脈、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)の亢進[1]によるさらなるうっ血の増悪および腎不全の悪化[3]があげられる。このような難治性症例の急性心不全治療として、人医領域ではミルリノン(Mil)とカルペリチド(Car)の併用療法が行われている[4]。しかし、犬における報告はない。

一方で、急性期を脱し慢性期移行後の治療も重要になってくる。例えば、犬のMRは最も頻繁にみられる後天性心疾患であるが、同時に肺高血圧症(PH)を呈している場合がある[5]。PHは収縮期肺動脈圧(sPA)が30mmHg以上または平均肺動脈圧が20mmHg以上に上昇した病態で

あり [6]、犬の生存期間中央値は診断から 3～91 日と報告され予後不良の疾患である [7,8]。従って、慢性心不全の犬において PH を管理するための治療は、臨床症状を軽減し、生存期間を改善できる可能性がある。PH の治療はアンジオテンシン変換酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、プロスタサイクリン製剤、ホスホジエステラーゼ (PDE) III 阻害薬および PDE V 阻害薬などが使用されているが [9,10]、多剤併用によっても重篤化を防げない症例も存在する。このような場合、人医領域では抗悪性腫瘍治療薬であるイマチニブが奏功し、肺血管抵抗を改善したと報告されている [11]。しかし、犬の PH におけるイマチニブの効果は分かっていない。さらにまた、人医領域において HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンは多面的効果を有するため、慢性心不全の進展を抑制することが期待されている [12]。その多面的効果とは、レニン・アンジオテンシン系の抑制作用や抗炎症作用および抗酸化作用が認められている [13]。しかし、犬の慢性心不全においてスタチンの及ぼす影響は明らかではない。このように獣医領域における急性および慢性心不全治療薬として、既存の一般的治療薬だけでは決して十分とはいえない。

第 1 章では肺水腫を伴う左心不全または PH による右心不全を呈した重症急性心不全犬に対して、Mil と Car

の低用量併用療法の有用性を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では MR または慢性フィラリア症により PH を呈した慢性心不全犬に対して、低用量イマチニブ療法の有用性を明らかにすることを目的とした。

第 3 章では健康犬において HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるプラバスタチン (PS) が循環パラメータと血液生化学的性状に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

第 4 章では MR が原因の ISACHC II および ACVIM ステージ C を呈した慢性心不全犬に対して、PS 療法の有用性を明らかにすることを目的とした。

## 第 1 章

重症心不全犬におけるミルリノンとカルペリチド  
の低用量併用療法の効果

## 緒言

急性心不全は、急性肺水腫や慢性心不全の急性増悪などにより起こり、左心不全では肺うっ血が主体で、右心不全は全身静脈がうっ血した状態である。どちらの心不全も心拍出量(CO)低下を伴うことが多い。獣医領域では薬物による急性心不全の治療が主体であり、血管拡張薬、利尿薬、カテコラミン製剤を中心として使用されている。また、軽症例および初発症例ではこれらの薬剤に奏効することが多いが、重症例や急性心不全再発例では反応が低いことがある。その原因として薬剤耐性[1,2]、不整脈、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)の亢進[1]による更なるうっ血の増悪および腎不全の悪化[3]があげられる。このような難治性症例の治療として人医領域では、ミルリノン(Mil)とカルペリチド(Car)併用療法が報告されている[4]。Milはホスホジエステラーゼ(PDE)Ⅲ阻害薬であり、心筋細胞と血管平滑筋細胞内のPDEⅢを直接阻害することで、心筋酸素消費量を増加することなく心収縮力を増大でき[14]、β受容体を介さず効果を発揮できるためカテコラミン製剤抵抗例においても有効である。また、血管平滑筋においては、筋小胞体へのCa<sup>2+</sup>の取り込みを促進することで、血管弛緩作用を示し[15]、肺動脈圧を低下させる点も注目されている[16]。



一方、Car は心房性ナトリウム利尿ペプチド<sup>®</sup>製剤であり、血管平滑筋細胞において cGMP の合成を促進することによる血管拡張効果 [17] や利尿作用 [18] によりうっ血を改善する。さらに RAAS や交感神経系由来の神経体液性因子の過剰な活性化を抑制する [19]。また、Car の使用による血圧低下は反射性頻脈を起こさないことが報告されている [18]。このように Mil と Car は急性心不全に則した治療薬といえるが、Mil 単剤では RAAS 亢進の可能性が危惧され、Car 単剤では CO 増加作用はきわめて弱い [18]。そこで本研究の目的は、Mil と Car を併用することで両薬剤の特徴を利用し、重症心不全犬への治療効果を調べることを目的とした。

## 材料および方法

### 供試動物

5 症例の犬種、年齢、性別、体重、診断名、うっ血所見および病型を表 1 に示した。各飼主は食欲廃絶、発咳、呼吸困難、歩行不能に気付き来院し、各症例とも心不全機能的分類では ISACHC III b を呈しており、慢性心不全の急性増悪例であった。

### 薬物投与

Mil(ミルリーラ注射液、アステラス製薬(株)、東京)と Car(ハンブ注射用 1000、第一三共(株)、東京)は、5%ブドウ糖溶液中にて少量の持続点滴(1~2 ml/kg/hr)を

行うと共に、Milは全例で0.5 µg/kg/minの投与速度で、Carでは症例3のみ0.05 µg/kg/minで投与し、他の4例は0.025 µg/kg/minの持続点滴投与を行った。また、緊急を要したために全例においてフロセミド(ラシックス注、サノフィ・アベンティス(株)、東京)を併用した。点滴前後には、一般身体検査、一般血液検査、血液生化学検査、レントゲン検査、心拍数(HR)測定、血圧測定および心エコー検査を実施した。また、各症例の入院中におけるMil、Carおよびフロセミドの使用量を算出した。

### 血液生化学検査

血中尿素窒素(BUN)濃度、クレアチニン(CRE)濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性、総ビリルビン(TBIL)濃度、アルブミン(ALB)濃度は、ドライケミストリー法(富士ドライケム3500V、富士フィルムメディカル(株)、東京)にて測定し、血漿カリウム(K)濃度は富士ドライケム800V(富士フィルムメディカル(株)、東京)にて測定した。血清の脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント(NT-proBNP)濃度は、アイデックスラボラトリーズ(株)(東京)にてマイクロプレートELISA法で測定した。

### 心臓超音波検査と各種循環パラメータ

血圧とHRは全自動電子血圧計(ダイナマップ8300、CRITIKON、U.S.A.)を用い、オシロメトリック法にて測

定した。心エコー検査は、超音波機器(Prosound α7、アロカ(株)、東京)を用い、Mモード法で左室内径短縮率(FS)[20]、左室駆出率(EF)[20]、拡張末期中隔壁厚(IVSd)、拡張末期左室内径(LVIDd)、拡張末期左室自由壁(LVPWd)、縮末期中隔壁厚(IVSs)、収縮末期左室内径(LVIDs)、収縮末期左室自由壁厚(LVPWs)を測定した。

パルスドプラ法(PD)を用いて、左室流入波形において拡張早期波(E波)、心房収縮期波(A波)、E波とA波の比(E/A)を測定した。また、左室流入波形と心尖部五腔断面像による左室流出波形から求めた左室 Tei index[21]、右室流入波形と心基部短軸像による右室流出波形から求めた右室 Tei index を測定した[21]。また、心尖部五腔断面像による左室流出路像からCOを測定した。連続波ドプラ法(CW)を用いて、収縮期僧帽弁最高逆流速(MRmax)、収縮期三尖弁最高逆流速(TRmax)、拡張期肺動脈弁最高逆流速(PRmax)を測定した。収縮期肺動脈圧(sPA)は、CWによるTRmaxから簡易ベルヌーイ式を用いて圧較差を求め[22]、推定右房圧の10 mmHgを加算して算出した。推定左室拡張末期圧(LVEDP)は、肺動脈弁逆流(PR)または体血圧から求めた。すなわち、PRからの推定は、CWによる拡張末期PRmaxから、簡易ベルヌーイ式にて求めた値に、推定右房圧の10 mmHgを加算して算出した。体血圧からの推定は、CWによるMRmaxから簡易ベルヌーイ式にて圧較差を求め、収縮期血圧(SBP)から圧較差を引

くことにより算出した。症例 2 と症例 4 は PR から LVEDP を推定し、症例 1、3、5 は体血圧から LVEDP を推定した。

組織ドプラ法では、心尖部四腔像における僧帽弁輪部中隔側にサンプルボリュームを置き、僧帽弁輪部運動速波形から拡張早期波 (Em) と心房収縮期波 (Am) を測定した。また、左室流入波形での E 波と Em との比 (E/Em) を求めた。

### 統計分析

Mil と Car 投与直前値を Pre、Mil と Car 投与終了時を Post とした。各データを平均±標準偏差で示した。Pre と Post 間の比較においては、個体数が 3 以上のデータに対して Paired *t*-test もしくは Mann-Whitney の U 検定を用いて統計解析を行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 結果

表 2 に血液生化学データを示した。BUN 濃度は Pre で高値を示したが、Post で有意に ( $P < 0.01$ ) 減少した。NT-proBNP 濃度は Pre で著しく高値を示し、Pre と比較して Post での有意な減少を認めなかった。CRE 濃度、AST 活性、ALT 活性、TBIL 濃度、ALB 濃度および K 濃度には、Pre と Post 間での有意差はなかった。Mil と Car 併用治療後、5 症例とも腎機能や肝機能の悪化はみられなかった。

各種循環パラメータの測定値は表 3 に示した。SBP は Pre に比べ Post で低下傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、拡張期血圧 (DBP) にも Pre と Post 間での有意差はなかった。HR は Pre に比べ Post で有意に ( $P < 0.05$ ) 減少した。

心エコー検査による TRmax は Pre で重度に高値を示したが、Pre に比べ Post で有意に ( $P < 0.05$ ) 減少した。sPA も Pre で重度に上昇していたが、Post では Pre に比べ有意に ( $P < 0.01$ ) 低下した。LVEDP は Pre で高値を示したが、Post では Pre に比べ有意に ( $P < 0.01$ ) 低下した。

FS と EF は Pre に比べ Post で増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。IVSd、LVIDd、LVPWd、IVSs、LVIDs、LVPWs は Pre と Post 間で有意差はなかった。また、Pre に比べ Post で E 波は低下傾向、A 波は上昇傾向、E/A は低下傾向をそれぞれ示したが、いずれも有意差は認められなかった。

左室 Tei index と右室 Tei index は、それぞれ Pre で重度に高値を示していた。例数が少ないため有意差検定はできなかったが、Pre に比べ Post では顕著に低下した。CO と MRmax は Pre に比べ Post で上昇傾向を示したが、有意差は認められなかった。拡張末期 PRmax は Pre で重度に上昇しており、症例数の関係で有意差検定はできなかったが、Post で顕著に低下した。Em、Am、および E/Em には顕著な変化は認められなかった。

各症例の入院期間は3～5日で、入院中におけるフロセミドの1日当たりの平均使用量は0.8～1.5 mg/kgであった。Milの総使用量は4.8～9.3 mgで、Carの総使用量は360～610  $\mu$ gであった。MilとCarの1日当たりの投与時間は、第1病日では18～24時間持続点滴を行い、第2病日以降は呼吸やうっ血の改善状態により短縮した。

表1 各症例のプロフィール

| 症例 | 犬種   | 年齢(歳) | 性別 | 体重(kg) | 診断名            | うっ血所見 | 病型   | ISACHC 重症度分類 |
|----|------|-------|----|--------|----------------|-------|------|--------------|
| 1  | シーズー | 13    | 雄  | 3.5    | MR,TR,PH       | 腹水    | 右心不全 | IIIb         |
| 2  | 雑種   | 15    | 雄  | 11.0   | TR,PR,PH       | 胸水,腹水 | 右心不全 | IIIb         |
| 3  | シーズー | 13    | 雌  | 5.3    | MR             | 肺水腫   | 左心不全 | IIIb         |
| 4  | 雑種   | 12    | 雄  | 7.5    | CS<br>TR,PR,PH | 胸水,腹水 | 右心不全 | IIIb         |
| 5  | 雑種   | 13    | 雄  | 14.1   | CS<br>MR,TR,PH | 腹水    | 右心不全 | IIIb         |

MR:僧帽弁閉鎖不全症 TR:三尖弁閉鎖不全症 PH:肺高血圧症 CS:急性フィラリア症 PR:肺動脈弁閉鎖不全症

表 2 血液生化学検査

| 検査項目      | 単位     | 基準範囲     | Pre       | Post       |
|-----------|--------|----------|-----------|------------|
| BUN       | mg/dl  | 9.2－29.2 | 53.6±37.1 | 37.0±13.9* |
| CRE       | mg/dl  | 0.4－1.4  | 0.9±0.5   | 0.7±0.3    |
| AST       | IU/l   | 17－44    | 38.8±29.2 | 24.6±7.8   |
| ALT       | IU/l   | 17－78    | 69.4±54.5 | 62±39.6    |
| TBIL      | mg/dl  | 0.1－0.5  | 0.4±0.1   | 0.3±0.1    |
| ALB       | g/dl   | 2.6－4.0  | 2.9±0.4   | 3.0±0.6    |
| K         | mmol/l | 3.8－5.0  | 4.5±0.6   | 4.2±0.6    |
| NT-proBNP | pmol/l | < 900    | 2620±2336 | 2435±2089  |

平均±標準偏差 (n=5) \*  $P < 0.01$  vs Pre



表3 各種循環パラメータの測定値

|                   | n | Pre         | Post         |
|-------------------|---|-------------|--------------|
| SBP (mmHg)        | 5 | 110.6±26.6  | 104.6±28.6   |
| DBP (mmHg)        | 5 | 71.6±24.6   | 69.6±26.3    |
| HR (bpm)          | 5 | 146.4±5.0   | 126.2±14.7*  |
| FS (%)            | 3 | 45.4±11.5   | 48.0±10.9    |
| EF (%)            | 3 | 82.2±11.2   | 84.7±9.9     |
| IVSd (mm)         | 3 | 6.0±1.0     | 5.9±0.7      |
| LVIDd (mm)        | 3 | 23.7±10.8   | 24.8±11.2    |
| LVPWd (mm)        | 3 | 6.8±1.3     | 6.1±0.8      |
| IVSs (mm)         | 3 | 9.3±1.5     | 9.5±0.6      |
| LVIDs (mm)        | 3 | 12.5±5.7    | 12.4±5.1     |
| LVPWs (mm)        | 3 | 11.2±1.0    | 12.0±1.2     |
| E 波 (cm/s)        | 3 | 103.6±69.7  | 76.9±35.9    |
| A 波 (cm/s)        | 3 | 62.8±24.2   | 68.3±32.5    |
| E/A               | 3 | 1.78±1.51   | 1.19±0.58    |
| 左室 Tei index      | 2 | 0.900±0.57  | 0.359±0.06   |
| 右室 Tei index      | 2 | 0.885±0.58  | 0.443±0.11   |
| CO (l/min)        | 3 | 1.99±2.8    | 2.48±3.3     |
| MRmax (cm/s)      | 3 | 488.0±76.4  | 536.6±61.6   |
| TRmax (cm/s)      | 4 | 418.6±102.9 | 319.0±110.0* |
| 拡張末期 PRmax (cm/s) | 2 | 265.6±36.6  | 185.5±28.4   |
| Em (cm/s)         | 2 | 8.3±4.9     | 8.1±2.0      |
| Am (cm/s)         | 2 | 6.8±0.9     | 7.7±2.8      |
| E/Em              | 2 | 7.94±2.71   | 7.35±2.56    |
| sPA (mmHg)        | 4 | 83.3±32.3   | 54.4±23.3**  |
| LVEDP (mmHg)      | 5 | 30.3±10.7   | 12.1±11.0**  |

平均±標準偏差 SBP:収縮期血圧 DBP:拡張期血圧 IVSd:拡張末期中隔壁厚 LVIDd:拡張末期左室内径 LVPWd:拡張末期左室自由壁厚 IVSs:収縮末期中隔壁厚 LVIDs:収縮末期左室内径 LVPWs:収縮末期左室自由壁厚  
E 波:拡張早期波 A 波:心房収縮期波 CO:心拍出量 MRmax:僧帽弁最高逆流速度 TRmax:三尖弁最高逆流速度 PRmax:肺動脈弁最高逆流速度 Em:拡張早期波(僧帽弁輪部速度波形) Am:心房収縮期波(僧帽弁輪部速度波形) sPA:収縮期肺動脈圧 LVEDP:左室拡張末期圧 \* $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs Pre

## 考察

本研究では症例 1、3、5 に僧帽弁逆流 (MR) を認めた。症例 3 は MR による末期の心不全状態で肺水腫を繰り返しており、ニトロプルシドやドブタミン治療が無効で、高窒素血症の悪化もみられた。しかし本治療により急性期からの離脱に成功した。その理由として Mil と Car 併用療法は、心不全の重症化に伴い  $\beta$  受容体の数や反応性が低下するダウンレギュレーションや耐性獲得していたことが予測される本症例犬に対して、 $\beta$  受容体や一酸化窒素と無関係に効果を発揮できたことと、RAAS 亢進による更なるうっ血を抑制できた可能性が考えられた。また、本研究では本剤投与後 LVEDP は低下した。これは左房圧の低下を意味する。左房圧低下の結果、左室との圧較差が増加して、MRmax は上昇傾向を示し、左室流入波形である E 波は低下傾向を示すとともに、A 波は上昇傾向を示したと考えられた。

一方、肺高血圧症 (PH) は収縮期肺動脈圧が 30 mmHg 以上または平均肺動脈圧が 20 mmHg 以上に上昇した病態であり [6]、きわめて予後が悪く、人医領域では右心不全を呈した PH 患者の 5 年生存率は約 50 % である [23]。本研究では、症例 1、2、4 および 5 が PH を伴う右心不全を呈し、症例 1 は MR による肺静脈性 PH、症例 4 と 5 は犬糸状虫症による PH であったが、症例 2 の PH の原因は特

定できなかつた。本研究において、sPAは著しく高値を示し重度のPHを呈していたが、本剤投与後、TRmaxとsPAは有意に減少、拡張末期PRmaxは顕著に低下し、COは増加傾向を示した。これは、Milの肺動脈圧低下作用と強心作用およびCarの利尿作用による前負荷軽減、MilとCarの血管拡張作用による後負荷軽減およびそれに起因するCO増加によると考えられ、これらにより急性増悪病態を改善できたと推察された。

急性フィラリア症(Caval syndrome:CS)では、右房内のフィラリア虫体を迅速に摘出する必要があるが、Kitagawaら[24]は虫体摘出後に生き延びた犬は三尖弁逆流(TR)が消失したが、死亡した犬はTRが残ったと述べており、虫体を摘出した後でもTRやPHが残っていれば予後不良である[25]。症例4は26隻摘出し、症例5は1隻摘出したが、PHの完全な消失には至らなかった。今回、右心不全症状があり、虫体摘出後もPHが残存するという予後不良の症例が救命できたのは、術前からMilとCarを併用することで、体血圧とCOを減少させずに肺動脈圧を低下できたことによると考えられた。

HR低下は、Carによる交感神経系やRAAS亢進の抑制効果[19]を示唆している。MilとCarの薬用量に関して、麻酔犬のデータではMilは $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ にてHR増加作用と血圧下降作用を発現し[15]、急性うっ血性心不全モデル犬ではCar $0.1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で血圧が低下し、用量依存的

に CO が減少すると報告されている [18]。そこで、Mil と Car を併用するにあたって、血圧低下による血行動態の悪化が懸念されたため、上記報告よりも各々低用量にて併用する事で単剤使用時よりも副作用を軽減でき、強心作用、血管拡張作用、RAAS 亢進の抑制作用などの両薬剤の特徴を活かせると考えた。このような仮説で本研究を行った結果、低用量である Mil と Car を投与することで血行動態を悪化させることなく順調に回復した。また、総合的心機能指標である Tei index の減少は、本治療による予後改善を示唆していると思われる。

重度心不全犬は高窒素血症や腎不全を伴っていることが多く、Nicolle ら [26] は、高窒素血症のある重度弁膜症犬のフロセミド平均投与量は 2.8 mg/kg であったと報告している。本研究のフロセミド平均投与量は 0.8 ~ 1.5 mg/kg/日であり、腎保護の観点からも利尿薬は必要最小限にとどめることができたため、高窒素血症を改善し、腎不全の悪化を防止できたと考えられた。また、急性期を脱し慢性期移行後においても RAAS 活性化の抑制を念頭においた治療が必要と思われる。

以上のように、Mil と Car の低用量併用療法は、MR が原因の肺水腫、フィラリアや TR および MR が原因の PH による慢性心不全急性増悪期の犬に対する有効な治療法となることが示唆された。本併用療法は、筆者の知る限り、犬の臨床への有用性を示した最初の報告である。

## 第 2 章

犬の肺高血圧症に対する  
低用量イマチニブの治療効果

## 緒言

肺高血圧症は(PH)、収縮期肺動脈圧(sPA)が 30 mmHg 以上または平均肺動脈圧が 20 mmHg 以上に上昇した病態 [6]である。PH は人医領域において死亡、難治例の予見因子のひとつであり [27,28]、予後不良を伴う進行性病態と考えられている [29]。また、PH と診断された犬は予後不良であり、生存期間中央値は診断から 3~91 日と報告されている [7,8]。無症候性僧帽弁閉鎖不全症(MR)の犬において、より高度な MR は PH を呈する [5]。したがって、慢性心不全の犬において PH を管理するための治療は、臨床症状を軽減し、生存期間を改善できるかもしれない。

PH 要因のひとつは、肺動脈血管収縮と肺血管リモデリングに起因する肺血管抵抗増加によるものである [30,31]。このリモデリングの進展には、さまざまな細胞内外の signaling 異常が関与することが示されている [32]。ヒトにおける PH 患者の肺血管病変では、血小板由来成長因子(PDGF)および PDGF 受容体の m-RNA が過剰発現していることが明らかにされている [33]。加えて、PH 患者から得られた肺動脈平滑筋細胞は正常と比較して増殖しており、さらに *in vitro* にて PDGF を投与した際、肺動脈平滑筋細胞は著しく増殖することが観察された [34]。この PDGF によって引き起こされる過剰な肺動脈平

滑筋細胞 (PASMCs) の増殖を防ぐことが、肺血管リモデリングの抑制につながる可能性がある [33]。人の PH 患者において PDGF が重要な役割を果たす可能性があり、PDGF 経路をターゲットとする新しい治療的戦略が臨床試験で検査されなければならないことを示唆した [33]。イマチニブは分子標的治療薬であり、PDGF 受容体チロシンキナーゼのリン酸化を阻害することにより、その活性化も阻害することが分かっている [35]。人では慢性骨髄性白血病、消化管間質腫瘍、強皮症に、犬では肥満細胞腫、消化管間質腫瘍にイマチニブは使用されている [36,37]。イマチニブは PH 治療薬の性質も兼ね備えており、PH 分子病態の要因である PDGF 受容体を阻害する [38]。In vitro で人 PH 患者の肺動脈平滑筋細胞は、PDGF によって増殖および遊走が誘発される。しかし、イマチニブはこの増殖と遊走を阻害する [33]。モノクロタリン誘発性 PH ラットの試験では、イマチニブが肺血管リモデリングを消褪させ PH を改善することが示され [39]、急速に進行している人家族性特発性 PH 患者では、イマチニブが効果的であったと報告されている [11]。最近ではイマチニブを含むチロシンキナーゼ阻害剤が PH ラットで有力な肺血管拡張作用を示すとも報告された。そしてこの作用は PH に対して長期的に有益な効果を示した [40]。しかし、筆者の知る限り、犬の PH に対するイマチニブの報告はない。本研究は、MR と慢性犬糸状虫症を呈した PH 症

例に対する低用量イマチニブ療法の臨床効果と血液および循環パラメータの影響を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 供試動物

飼い主が所有する PH のある 6 頭の症例犬は、有田総合動物病院と鳥取大学動物医療センターで集められた。全ての犬のデータは 2010 年 7 月から 2011 年までに得られた。十分なインフォームドコンセントをすべての犬の飼い主から得た。PH の診断は 30 mmHg 以上の sPA と定義し、簡易ベルヌーイ式を用いて計算を行い、推定右房圧を加えて算出した。6 症例の犬種、年齢、性別、体重、診断名、肺高血圧症の病因、臨床症状および ISACHC 重症度分類を表 4 に示した。イマチニブ投与直前の sPA 値の平均±標準偏差 (SD) は、 $63.3 \pm 24.9$  mmHg であった。ISACHC 重症度分類は II から III a を呈し、全例において失神と発咳がみられた。全ての犬の発咳は 1～3 年前からみられた。フィラリア犬 (症例 5 と 6) に関する発咳は、好酸球性気管支炎も含まれる可能性がある。フィラリア症の犬はイマチニブ治療前に成虫駆除剤での処置をせず、イマチニブ治療の間の心臓エコー検査にて 2～3 隻のフィラリア虫体が確認できた。

### 薬剤



症例 1 はアラセプリル 3.5 mg/kg BID、ピモベンダン 0.2 mg/kg BID、フロセミド 1.5 mg/kg BID、スピロノラクトン 2 mg/kg BID、ヒドロクロチアジド 2 mg/kg BID、ベラプロストナトリウム 0.8 µg/kg BID で 5 カ月間治療中であつた。症例 2 はベナゼプリル 0.4 mg/kg BID、ピモベンダン 0.2 mg/kg BID にて 4 カ月間治療中、症例 3 はアラセプリル 1.4 mg/kg BID、ピモベンダン 0.12 mg/kg BID にて 4 カ月間治療中、症例 4 はベナゼプリル 0.5 mg/kg BID、ピモベンダン 0.15 mg/kg BID にて 1 カ月間治療中、症例 5 はアラセプリル 2 mg/kg BID、ピモベンダン 0.2 mg/kg BID、フロセミド 1.4 mg/kg BID、スピロノラクトン 2 mg/kg BID にて 1 カ月間治療中、症例 6 はアラセプリル 2 mg/kg BID、ピモベンダン 0.2 mg/kg BID、フロセミド 1.4 mg/kg BID、スピロノラクトン 2 mg/kg BID にて 1 カ月間治療中であつた。

全ての症例でメシル酸イマチニブ(グリベック、ノバルティス・ファーマ、東京、日本)は体重 kg 当たり 3 mg の低用量で 24 時間毎 30 日間経口投与した。イマチニブ投与前と投与中におけるこれらの治療薬は、検査期間中全く変更しなかつた。イマチニブ投薬前(Pre)と投薬 30 日後(Post)には、一般身体検査、一般血液検査、血液生化学検査、レントゲン検査、心拍数(HR)測定、血圧測定および心エコー検査を少なくとも 3 回実施した。

## 臨床評価

全ての犬において発咳、運動不耐性、失神、腹水や浮腫所見などの臨床所見は Pre と Post で調査した。腹水と浮腫は身体検査、レントゲン検査およびエコー検査にて調べ、それ以外は飼い主への問診にて行った。発咳、運動不耐性、失神、腹水や浮腫所見スコアは表 5 の脚注で示すように、以前報告されている方法 [9] を参考に臨床症状を評価した。総スコアは発咳、運動不耐性、失神、腹水や浮腫の 4 つの合計で算出した。

#### **血液検査および血液生化学検査**

血液は Pre と Post の検査時に各症例の頸静脈から 7.0 ml 採取した。1.0 ml の血液は血球計算のために EDTA と混合し、1.0 ml は血漿生化学測定のためにヘパリンと混合した。加えて、3.0 ml は心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 濃度測定のためにアプロチニン入り EDTA と混合した。残りの 2.0 ml は N 末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP) 濃度測定のために血清用チューブに移し、各検体は遠心分離により血漿または血清に分離した。血球計算は自動血球分析装置を用いて測定した。血中尿素窒素 (BUN) 濃度、クレアチニン (CRE) 濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性、総ビリルビン (TBIL) 濃度、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) 活性、無機リン (IP) 濃度、総コレステロール (TCHO) 濃度、トリグリセライド

(TG)濃度は、ドライケミストリー法(富士ドライケム 3500V、富士フィルムメディカル、東京、日本)にて測定した。血漿ナトリウム(Na)濃度、血漿カリウム(K)濃度、血漿クロール(Cl)濃度は、富士ドライケム 800V(富士フィルムメディカル、東京、日本)にて測定した。NT-proBNP濃度は、アイデックスラボラトリーズ(東京、日本)にてマイクロプレート ELISA 法で測定した。ANP濃度は、福山臨床検査センター(広島、日本)にて化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法)で測定した[41]。ANP濃度、NT-proBNP濃度は-40℃で保存し、1日以内に検査センターに送った。その他の血液サンプルは直ちに測定した。

#### 心エコー検査と各種循環パラメータの測定

収縮期血圧(SBP)、拡張期血圧(DBP)、平均血圧(MAP)は、全自動電子血圧計(ダイナマップ 8300、CRITIKON、U.S.A.)を用い、腹臥位にて尾根部に装着し、オシロメトリック法にて測定した。心エコー検査は、超音波機器(Prosound α7、日立アロカメディカル、東京、日本)を用い、プローブは5MHzを使用した。検査は経胸壁2次元的にMモード法、パルスドプラ法と連続波ドプラ法および組織ドプラ法にて右または左側横臥位で実施した。心拍数(HR)は同時に記録される心電図上のR-R間隔から算出した。

Mモード法では右横臥位にて左室長軸流出路像から左心房/大動脈径比(LA/Ao)を測定した。左室短軸像から左

室内径短縮率 (FS)[20]、左室駆出率 (EF)[20]、拡張末期中隔壁厚 (IVSd)、拡張末期左室内径 (LVIDd)、拡張末期左室自由壁厚 (LVPWd)、収縮末期中隔壁厚 (IVSs)、収縮末期左室内径 (LVIDs)および収縮末期左室自由壁厚 (LVPWs)を測定した。

パルスドプラ法は左側横臥位からの四腔断面像にて、左室流入波形の拡張早期波 (E波)、心房収縮期波 (A波)、E波とA波の比 (E/A)、E波減速時間 (DecT)を測定した。また、心尖部五腔断面においてサンプルボリュームを大動脈弁直下に置き、左室流出路断面積 (CSA)、大動脈血流速 (AEV)、流速積分値 (TVI)を測定し、1回拍出量 (SV)[42]および心拍出量 (CO)を計測した。COは  $SV \times HR$  として算出した。さらに、四腔断面での左室流入血流終了から再流入開始までの時間を a 時間、心尖部五腔断面像による左室駆出血流の開始から終了までを b 時間として、 $Tei\ index = (a - b) / b$ にて左室 Tei index を求めた [21]。同様に右室 Tei index も、四腔断面での三尖弁流入血流終了から再流入開始までの時間と心基部短軸像による右室駆出血流開始から終了までを求めて測定した [21]。

連続波ドプラ法を用いて、収縮期僧帽弁最高逆流速 (MRmax)は左側胸壁からの四腔断面にて測定した。収縮期三尖弁最高逆流速 (TRmax)は、左右胸壁からの四腔断面像と左側大動脈短軸像にて測定し、最も高い数値を使用した。拡張末期肺動脈弁最高逆流速 (PRmax)は 2 頭の

犬(症例 5 と 6)のみ観察され、心基部短軸像にて測定した。収縮期肺動脈圧(sPA)は、簡易ベルヌーイ式を用いて  $4 \times (\text{TRmax})^2$  から圧較差を求め[22]、この値に推定右房圧を加算して算出した。推定右房圧は、3例(症例 1、5、6)は 15 mmHg とし、他 3例(症例 2、3、4)は 10 mmHg で算出した。肺動脈弁逆流がみられた犬は 2頭だけで、肺動脈楔入圧(拡張末期肺動脈圧)は簡易ベルヌーイ式を用いて  $4 \times (\text{拡張末期 PRmax})^2$  から圧較差を求め、この値に推定右房圧の 10 mmHg を加算して算出した[22]。

組織ドプラ法では、心尖部四腔像における僧帽弁輪部中隔側にサンプルボリュームを置き、僧帽弁輪部運動速波形を記録した。拡張早期波(Em)と心房収縮期波(Am)を測定し、Em と Am の比(Em/Am)を求めた。また、左室流入波形での E 波と Em との比(E/Em)も求めた。さらに、左室短軸像では左室後壁の心内膜側の速度(Vend)と心外膜側の速度(Vepi)を計測し、その差を 2 点間の距離で除することにより心筋速度勾配(MVG)を算出した[43]。MVG は収縮中期(MVGs)、拡張早期(MVGe)、心房収縮期(MVGa)にてそれぞれ計測した。各心エコーパラメータの測定は、少なくとも 3 回繰り返し行い、その平均値をデータとして採用した。全ての症例の測定と追跡調査は同一の測定者により行った。

## 統計解析

統計解析は、市販のソフトウェア (StatMate3、ATMS、東京、日本) で行った。各データを平均±標準偏差 (SD) で示した。Pre と Post 間の比較においては、個体数が 3 以上のデータに対して行い、血液検査と各種循環パラメータは Paired *t*-test にて解析を行った。LSD 試験は sPA において Before-Pre、Pre、Post 間の多重比較を LSD-test により行った。臨床症状スコアデータは wilcoxon の符号付き順位検定を用いて解析を行った。いずれも  $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 結果

### 臨床症状スコア

臨床症状スコアは表 5 に示した。発咳と総スコアは Pre に比べ Post で有意に ( $P < 0.05$ ) 改善した。運動不耐性、失神および腹水・浮腫所見は Pre と Post 間で有意差はなかったが、改善傾向を示した。

### 心エコー検査と各種循環パラメータ

6 症例の sPA 値の変化を表 6 に示した。一般的治療薬で治療中の間、sPA は 14~40 日で有意に増加した。増加した sPA は Pre と比べ、イマチニブ療法の後 (Post) で有意に、そして顕著に減少した。さらに、Post の sPA は Before-Pre 値と比較しても有意に減少した。

他の心エコー循環パラメータデータは表 7 に示した。HR はイマチニブ療法後に有意に減少した。DBP はイマ

チニブ治療後に有意に上昇した。TRmaxはイマチニブ治療前に顕著に上昇していたが、治療後で有意に低下した。Post値のFS、EF、SV、COおよびTVIはPre値と比較して有意に増加した。左室と右室TeiindexはPreで重度に高値を示したが、イマチニブ治療後に有意に低下した。LA/Aoはイマチニブ投与後に有意に低下した。PostのE波、A波、E/AおよびAmはPreと比べて有意差はなかった。DecTとEmおよびEm/Amはイマチニブ治療後に有意に増加した。対照的にE/Emはイマチニブ投与後に有意に低下した。AEVとMRmaxはPre値と比べ有意差は認められなかった。2頭の犬(症例5と6)のPRmaxは、イマチニブ療法後、減少した。拡張末期肺動脈圧は1例ではPre値30.3 mmHgから24.6 mmHgに、他の症例はPre値32.8 mmHgから21.3 mmHgに減少した。収縮中期Vend-Vepiはイマチニブ治療後に有意に上昇した。IVSd、LVIDd、LVPWd、IVSs、LVIDs、LVPWs値はPreとPost間において有意差はなかった。MVGsは治療後に上昇傾向を示したが、有意差は認められなかった。

#### 血液検査と血液生化学検査の変化

ANP濃度のPre値は著しく上昇していた(平均±SD, n=6; 96.6±56.3 pg/ml)が、イマチニブ治療後(77.8±53.4 pg/ml)に有意に低下した( $P<0.001$ )。同様にNT-proBNPとBUN値はイマチニブ療法前に上昇していた(3121±3645 pmol/lと30.0±13.8 mg/dl)。イマチニブ療法後の有意差

はみられなかったが、それぞれ減少傾向であった ( $2777 \pm 3230$  pmol/l と  $23.7 \pm 8.2$  mg/dl)。PCV 値、総白血球数、血小板数、CRE、AST、ALT、TBIL、ALP、CPK、IP、TCHO、TG、Na、K および Cl 値はイマチニブ治療後の影響はなかった。



表4 各症例のプロフィール

| 症例 | 犬種    | 年齢<br>(歳) | 性別 | 体重<br>(BW) | 診断名      | 肺高血圧症の病因       | 臨床症状               | ISACHC<br>重症度分類 |
|----|-------|-----------|----|------------|----------|----------------|--------------------|-----------------|
| 1  | シーザー  | 14        | 雄  | 3.6        | MR,TR    | MRによる肺静脈性PH    | 失神,発咳,腹水,運動<br>不耐性 | IIIa            |
| 2  | マルチーズ | 14        | 雌  | 2.5        | MR,TR    | MRによる肺静脈性PH    | 失神,発咳,<br>運動不耐性    | IIIa            |
| 3  | シーザー  | 16        | 雄  | 4.6        | MR,TR    | MRによる肺静脈性PH    | 失神,発咳,<br>運動不耐性    | II              |
| 4  | プードル  | 7         | 雄  | 4.3        | MR,TR    | MRによる肺静脈性PH    | 失神,発咳              | II              |
| 5  | 雑種    | 9         | 雌  | 8.0        | MR,TR,PR | 犬糸状虫症による肺動脈性PH | 失神,発咳,胸水,運動<br>不耐性 | IIIa            |
| 6  | 雑種    | 14        | 雌  | 9.0        | MR,TR,PR | 犬糸状虫症による肺動脈性PH | 失神,発咳,腹水,運動<br>不耐性 | IIIa            |

MR:僧帽弁閉鎖不全症 TR:三尖弁閉鎖不全症 PR:肺動脈弁閉鎖不全症 PH:肺高血圧症

表 5 イマチニブ投与前後の臨床症状のスコア

| スコア化の項目                 | Pre <sup>a</sup> | Post <sup>b</sup> |
|-------------------------|------------------|-------------------|
| 発咳スコア <sup>c</sup>      | 2.0±0.6          | 1.2±0.4*          |
| 運動不耐性スコア <sup>d</sup>   | 1.3±0.8          | 0.8±0.4           |
| 失神スコア <sup>e</sup>      | 1.2±0.4          | 0.5±0.5           |
| 腹水・浮腫所見スコア <sup>f</sup> | 1.0±1.1          | 0.3±0.5           |
| 総スコア                    | 5.5±2.6          | 2.7±1.5*          |

a—イマチニブ治療前; b—イマチニブ治療 30 日後; c 発咳スコア—0=なし; 1=わずか(2~3 回で止まる咳が 1 日のうち 9 回以内); 2=頻繁(2~3 回で止まる咳が 1 日のうち 10 回以上あり); 3=頻繁で長く持続(1 度で 4 回以上続く咳が 1 日に 10 回以上あり); d 運動不耐性スコア—0=正常; 1=軽度低下(喜んで吠えることもあるが寝ていることが多い); 2=重度低下(全く吠えずほとんど動かない); e 失神スコア—0=なし; 1=週に 1 回; 2=週に 1 回以上 6 回未満; 3=毎日; f 腹水・浮腫所見スコア—0=なし; 1=あるが減少; 2=あるが著変ないか悪化; 平均±標準偏差 (n=6) \*P<0.05 vs Pre

表 6 各症例の収縮期肺動脈圧の変化(mmHg)

| 症例 | Before-Pre <sup>a</sup> | Pre <sup>b</sup> | Post <sup>c</sup> |
|----|-------------------------|------------------|-------------------|
| 1  | 64 <sup>d</sup>         | 96.7             | 60.1              |
| 2  | 46 <sup>e</sup>         | 42.5             | 26.7              |
| 3  | 74 <sup>f</sup>         | 83.2             | 39.3              |
| 4  | 20.2 <sup>g</sup>       | 41.6             | 21.2              |
| 5  | 32.6 <sup>h</sup>       | 40.3             | 24.5              |
| 6  | 54.4 <sup>i</sup>       | 75.7             | 44.5              |
|    | 48.5±19.5 <sup>j</sup>  | 63.3±24.9*       | 36.1±14.8*†       |

a-イマチニブ投薬 14~40 日前; b-イマチニブ投薬直前; c-イマチニブ投薬 30 日後;  
d-イマチニブ投薬 20 日前; e-イマチニブ投薬 35 日前; f-イマチニブ投薬 20 日前;  
g-イマチニブ投薬 40 日前; h-イマチニブ投薬 14 日前; i-イマチニブ投薬 14 日前;  
j-平均±標準偏差(n=6);

\* $P < 0.05$ , Before-Pre に対し有意差あり; † $P < 0.01$ , Pre に対し有意差あり;

症例 1,5,6 は右房圧 15 mmHg と仮定; 症例 2,3,4 は推定右房圧 10 mmHg と仮定.

表7 各種循環パラメータの測定値

|                        | n | Pre         | Post          |
|------------------------|---|-------------|---------------|
| SBP (mmHg)             | 6 | 138±9       | 138±6         |
| DBP (mmHg)             | 6 | 82±14       | 93±13**       |
| MAP (mmHg)             | 6 | 102±8       | 105±8         |
| HR (bpm)               | 6 | 150±27      | 132±22**      |
| LA/Ao                  | 6 | 1.61±0.22   | 1.53±0.18*    |
| FS (%)                 | 6 | 43.9±4.5    | 49.9±3.9**    |
| EF (%)                 | 6 | 82.0±4.1    | 87.2±3.0**    |
| IVSd (mm)              | 6 | 6.4±1.4     | 6.0±1.2       |
| LVIDd (mm)             | 6 | 19.5±3.9    | 20.8±3.4      |
| LVPWd (mm)             | 6 | 6.4±1.3     | 6.2±1.3       |
| IVSs (mm)              | 6 | 10.2±1.8    | 9.7±1.1       |
| LVIDs (mm)             | 6 | 10.9±2.5    | 10.5±2.0      |
| LVPWs (mm)             | 6 | 9.3±1.9     | 9.6±1.3       |
| E 波 (cm/s)             | 6 | 71.4±23.2   | 74.7±26.1     |
| A 波 (cm/s)             | 6 | 86.9±20.1   | 84.3±25.0     |
| E/A                    | 6 | 0.82±0.16   | 0.94±0.31     |
| DecT (ms)              | 6 | 85±21       | 110±11**      |
| CSA (cm <sup>2</sup> ) | 6 | 0.49±0.18   | 0.51±0.19     |
| AEV (cm/s)             | 6 | 75.7±6.9    | 82.1±9.2      |
| TVI (cm)               | 6 | 7.1±1.0     | 8.7±0.9***    |
| SV (ml)                | 6 | 3.5±1.5     | 4.5±1.9**     |
| CO (l/min)             | 6 | 0.50±0.27   | 0.60±0.32**   |
| 左室 Tei index           | 6 | 0.392±0.103 | 0.301±0.069*  |
| 右室 Tei index           | 6 | 0.739±0.353 | 0.415±0.271** |
| MRmax (cm/s)           | 6 | 408±176     | 360±246       |
| TRmax (cm/s)           | 6 | 348±86      | 234±71***     |
| 拡張末期 PRmax (cm/s)      | 2 | 203±11      | 140±20        |
| 拡張末期肺動脈圧 (mmHg)        | 2 | 31.6±1.8    | 23.0±2.3      |
| sPA (mmHg)             | 6 | 63.3±24.9   | 36.1±14.8**   |
| Em (cm/s)              | 6 | 6.9±1.0     | 8.4±1.7*      |
| Am (cm/s)              | 6 | 8.5±1.8     | 7.9±2.5       |
| Em/Am                  | 6 | 0.83±0.14   | 1.11±0.22*    |
| E/Em                   | 6 | 10.4±3.5    | 9.0±3.2**     |
| 収縮中期 Vend—Vepi (cm/s)  | 6 | 1.59±0.52   | 2.27±0.86*    |
| 拡張早期 Vend—Vepi (cm/s)  | 6 | -2.06±1.05  | -2.05±0.52    |
| 心房収縮期 Vend—Vepi (cm/s) | 6 | -1.43±0.4   | -1.51±0.43    |
| 収縮中期距離 (cm)            | 6 | 0.77±0.21   | 0.74±0.21     |
| 拡張早期距離 (cm)            | 6 | 1.01±0.06   | 0.95±0.1      |
| 心房収縮期距離 (cm)           | 6 | 0.70±0.15   | 0.70±0.13     |
| MVGs (sec)             | 6 | 2.16±0.90   | 3.24±1.60     |
| MVGe (sec)             | 6 | -2.05±1.01  | -2.18±0.53    |
| MVGa (sec)             | 6 | -2.04±0.45  | -2.17±0.58    |

平均±標準偏差 SBP:収縮期血圧 DBP:拡張期血圧 MAP:平均血圧 IVSd:拡張末期中隔壁厚 LVIDd:拡張末期左室内径 LVPWd:拡張末期左室自由壁厚 IVSs:収縮末期中隔壁厚 LVIDs:収縮末期左室内径 LVPWs:収縮末期左室自由壁厚 E 波:拡張早期波 A 波:心房収縮期波 DecT:E 波減速時間 CSA:左室流出路断面積 AEV:大動脈血流速度 TVI:流速積分値 SV:1 回拍出量 CO:心拍出量 MRmax:僧帽弁最高逆流速度 TRmax:三尖弁最高逆流速度 PRmax:肺動脈弁最高逆流速度 sPA:収縮期肺動脈圧 Em:拡張早期波(僧帽弁輪部速度波形) Am:心房収縮期波(僧帽弁輪部速度波形) E/Em:E 波と Em との比 Vendo:心内膜側の速度 Vepi:心外膜側の速度 MVGs:収縮中期心筋速度勾配 MVGe:拡張早期心筋速度勾配 MVGa:心房収縮期心筋速度勾配 \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001vs Pre

## 考察

人医領域において PH 症例のイマチニブ薬用量は、100~200 mg/日で使用されている [11,44]。これは抗悪性腫瘍剤投与量の約 1/3~1/6 量である。犬の抗悪性腫瘍剤は 10 mg/kg/日で使用されている [36]。マウス実験においても、イマチニブは高用量よりも低用量のほうが肺線維症を軽減したと報告されている [45]。さらに、PH 患者においてイマチニブ投与 4 週間後に血漿 PDGF 濃度が減少したという報告もある [44]。これらの報告を参考にして本研究のイマチニブ投与量は、犬の抗悪性腫瘍剤投薬量の約 1/3 量である 3 mg/kg/日、30 日間の投与期間として検討した。本研究は、PAH を呈した犬の慢性心不全において 30 日間の低用量イマチニブ投与が有意に且つ著しい改善効果を示すことを明らかにしたはじめての報告である。また、イマチニブによる改善効果の要因のひとつとしては、肺動脈リモデリングの減少である可能性を示唆した。本研究では全ての症例で三尖弁逆流 (TR) と同様に MR を有していた。4 症例は MR による肺静脈性 PH で、2 症例は慢性犬糸状虫症による肺動脈性 PH であった。PH 犬の一般治療薬としては、ACE 阻害剤、カルシウム拮抗剤、プロスタサイクリン製剤、PDEⅢ 阻害剤、PDEV 阻害剤などが使用されている [9,10]。しかしながら、多剤併用によっても症状悪化を止められない症例も存在する。

そのような患者に対して人医領域ではイマチニブが奏功し、肺血管抵抗を改善したと報告されている [11,44,46]。本研究では発咳と総合的な臨床スコアがイマチニブ治療によって改善した。

本研究において、イマチニブ療法は TRmax と sPA を低下させ、FS、EF、SV および CO を増加させた。イマチニブ療法による右室 Tei index 低下要因のひとつは、肺動脈圧減少による右室後負荷の軽減に起因する可能性がある。また、本研究の結果はイマチニブ投与が右室拡張期圧を低下させ、右房圧の低下、末梢静脈圧の低下を招来したことを示唆した。左心系では肺静脈圧もまた、イマチニブの肺静脈拡張作用によって減少できた可能性があり [40]、左房圧減少と左室還流量の増加を起こした可能性がある。さらに、左房圧の減少は左主気管支の圧迫を減じ、発咳頻度を減少する可能性がある。本研究では左房圧減少を示唆する LA/Ao と E/Em は、イマチニブ治療後に有意に低下した。一方、イマチニブ治療による右室後負荷の減少は、左室前負荷の上昇を誘発する可能性があり、本研究で認められた CO の増加は Frank-Starling の機序による可能性もある。このような機序が背景にあるとすれば、MR 犬のイマチニブ治療は左室容量負荷の増大による肺うっ血を起こす可能性が危惧されたが、本研究の結果では肺うっ血は起こらず、むしろ改善した。したがって、これらの効果はイマチニブによる抗炎症作

用と抗線維化作用[47]および PDGF 受容体拮抗作用[38]が及ぼす肺血管リモデリングの改善による肺血管抵抗の減少、さらにイマチニブによる有力な肺血管拡張作用[40]による肺血管抵抗の減少に起因したのではないかと推察された。

本研究において、PH 犬イマチニブ療法後の E/Em の低下は左房圧の減少を示唆した。犬の MR において sPA と左房逆流分画は相関関係にあると報告されている[48]。従って、本研究のイマチニブ治療後の左房圧低下は、sPA の減少に起因した可能性がある。本研究でイマチニブ治療後に観察された sPA、SV および CO を含めた血行パラメータの改善は、ラットにおける報告と一致した[49]。

重度 MR 犬において、LVIDd の増加と HR 上昇および LA/Ao の増加は死亡予見因子であると報告されている[50,51]。しかし、本研究ではイマチニブ治療により HR と LA/Ao は有意に減少し、LVIDd の増加はなかった。加えて、本研究で認められたイマチニブ療法後の右室と左室 Tei index の有意な減少は、PH 犬の心不全をイマチニブが改善し得ることを示唆している。一方で、ANP 値や NT-proBNP 値の上昇は心疾患犬の予後指標であることも示されている[50,52,53]。本研究において、イマチニブ治療後の ANP 値は有意に減少し、NT-proBNP 値は減少傾向であった。これらの結果は、イマチニブの右室後負荷減少による血行動態改善によるものかもしれない。しかし、

それは肺血管床全体の血液量を増やすことにより、左室前負荷を増加させる可能性がある。また、ヒトの慢性心不全患者では肺動脈圧と心臓交感神経活性が正相関を示す[54]。今回の結果では、イマチニブ療法は心臓交感神経活性化の抑制を暗示するHRとsPAが有意に減少することを明らかにした。従って、PH犬に対してイマチニブ治療は、血行力学的負荷の抑制だけでなく心臓交感神経活性の抑制も心機能の保護につながり、予後を改善できた可能性がある。

イマチニブの安全性に関して、人医領域では5例のPH患者に低用量(100 mg/日)のイマチニブを24週間使用し、3例の患者において腎機能異常が観察されている[44]。しかし、消化器傷害を示唆する徴候のような他のいかなる有害事象も観察されなかったと報告されている[44]。本研究では30日間のイマチニブ治療中に腎臓や肝臓障害を暗示するような血液学的大約血液生化学的な異常はみられなかった。これはPH犬において低用量イマチニブ療法は、明らかな悪影響を及ぼすことなく安全に使用できることを示している。このように、PH犬における低用量イマチニブ療法は、全身血圧やCOを低下させることなく肺動脈圧を減少させ、心機能と血行動態を改善することを明らかにした。筆者の調べた限りでは、本研究はPAH犬の治療の有用性を示した初めての報告である。



## 第 3 章

健康犬におけるプラバスタチンの心エコーと  
血行力学的パラメータに及ぼす影響

## 緒言

プラバスタチン (PS) は HMG-CoA 還元酵素阻害薬であり、コレステロール合成経路であるメバロン酸経路において HMG-CoA 還元酵素を阻害することによりコレステロール値を低下させる [13]。人医領域において PS は脂質異常症治療薬としてだけではなく、心筋梗塞発生率と死亡率を低下させることが示されている [55,56]。この心血管保護効果の理由として、スタチン系薬物はコレステロール低下作用と同時に多面的効果 (pleiotropic effect) も有するからと考えられている [12]。例えば、PS はマウスの圧負荷実験にて心臓リモデリングを抑制する [57]。自然発症高血圧ラットにおいて PS 投与は心臓アンジオテンシン II (Ang II) 発現レベルを減少させる [58]。人ではスタチン系薬物が Ang II タイプ 1 受容体の発現レベルを低下させ、Ang II による血管収縮を抑制し、Ang II 受容体拮抗薬による効果を増強させると報告されている [59]。また、人において PS は抗炎症作用が示されており [60]、標準的治療 + プラセボの心筋梗塞患者の CRP レベルは 5 年後増加するが、PS 群は減少したと報告されている [61]。加えて、スタチン系薬物はラット、人において抗不整脈作用が報告されており [62,63,64,65,66]、また、PS は血栓形成性を減少させる作用も有する [67]。さらに、スタチン系薬物はメバロン酸経路を抑制することにより、PI3

キナーゼ Akt 経路を活性化させる [13]。その結果、内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) を活性化させ、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) の産生を増加させる [68,69,70]。加えて、NO の増加は血管内皮機能の改善や血管内皮前駆細胞 (EPC) 数の増加および分化を促進させて血管新生作用をもたらす作用も有する [71]。これらスタチンの心血管系への影響が、*in vitro* およびマウスや人の試験において証明されたことを考えると、PS は犬の心不全治療薬として貢献できるかもしれない。しかし、筆者の知る限り、犬の心血管系へ利用可能な研究は存在しない。そこで本研究は、健康な犬において PS が心エコー循環パラメータと血液生化学的変化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 実験動物

生後 9~19 ヶ月令、体重  $7.9 \pm 0.3 \text{ kg}$  (平均  $\pm$  SD) の避妊手術済みメスのビーグル犬を 5 頭用いた。全頭ともワクチンとフィラリア予防済みで一般身体検査、血液検査も問題なく一般健康状態は良好であった。この研究プロトコールは、鳥取大学動物実験委員会の承認を得た。

### 実験方法と薬剤投与

5 頭の犬は 4 群にそれぞれ無作為に割付けし、繰り返して使用した。1 つの群はコントロール (Cont) 群として

投薬を行わなかった。他の3群の犬はプラバスタチンナトリウム(PS: プラバスタチン Na 塩錠 10 mg、田辺三菱、大阪、日本)0.5、1.0、もしくは2.0 mg/kgを、24時間毎、4週間経口投与した。それぞれCont群、PS 0.5群、PS 1群およびPS 2群とし、いずれの群間でも30日間の休薬間隔をおいた。身体検査、血液生化学検査、血圧測定およびドプラ心エコー検査はPS投与前(time 0; ベースライン)と、PS投与1、2および4週間後に実施した。PSは朝食時に与え、その2時間後に各検査を実施した。

#### 血液検査および血液生化学検査

血液は頸静脈から10 ml採取した。1.0 mlの血液は血球計算のためにEDTAと混合し、1.0 mlは血漿生化学測定のためにヘパリンと混合した。加えて、3.0 mlは心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)濃度測定のためにアプロチニン入りEDTAと混合した。残りの5 mlはN末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド(NT-proBNP)濃度、高比重リポ蛋白コレステロール(High Density Lipoprotein Cholesterol, HDLC)濃度、低比重リポ蛋白コレステロール(Low Density Lipoprotein Cholesterol, LDLC)濃度およびNO測定のために血清用チューブに移した。遠心分離により血漿または血清を分離した。血球計算は自動血球分析装置を用いて実施した。血中尿素窒素(BUN)濃度、クレアチニン(CRE)濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性、アラニンアミノトランスフェラ

ーゼ (ALT) 活性、総ビリルビン (TBIL) 濃度、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) 活性、無機リン (IP) 濃度、総コレステロール (TCHO) 濃度およびトリグリセライド (TG) 濃度は、ドライケミストリー法 (富士ドライケム 3500V、富士フィルムメディカル、東京) にて測定した。血漿ナトリウム (Na)、血漿カリウム (K) および血漿クロール (Cl) 濃度は富士ドライケム 800V (富士フィルムメディカル、東京) にて測定した。ANP 濃度は福山臨床検査センター (広島) にて化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) で測定した。NT-proBNP 濃度は、アイデックスラボラトリーズ (東京) にてマイクロプレート ELISA 法で測定した。HDLc と LDLc 濃度は酵素法でモノリス (東京) にて測定し、NO は Nitric Oxide total detection キット (Enzo Life Sciences Inc. NY, U.S.A.) を使用し比色法にて測定した。血漿もしくは血清は -40℃ で保存し、ANP および NT-proBNP 濃度測定用サンプルは 1 日以内に検査センターに送った。NO 濃度は 1 ヶ月以内に測定した。その他の血液サンプルは直ちに測定した。

#### 各種循環パラメータの測定

平均血圧 (MBP) は、全自動電子血圧計 (ダイナマップ 8300、CRITIKON、U.S.A.) を用い、腹臥位にて尾根部に装着し、オシロメトリック法にて測定した。心エコー検査は、超音波機器 (Prosound  $\alpha$  7、日立アロカメディカル、

東京)を用い、プローブは 5 MHz を使用した。検査は経胸壁 2 次元的に M モード法、パルスドプラ法および組織ドプラ法にて右または左側横臥位で実施した。心拍数 (HR) は同時に記録される心電図上の R-R 間隔から算出した。

M モード法では、右横臥位にて左室長軸流出路像から左心房/大動脈径比 (LA/Ao) を測定した。左室短軸像から左室内径短縮率 (FS) [20]、左室駆出率 (EF) [20]、拡張末期中隔壁厚 (IVSd)、拡張末期左室内径 (LVIDd)、拡張末期左室自由壁厚 (LVPWd)、収縮末期中隔壁厚 (IVSs)、収縮末期左室内径 (LVIDs) および収縮末期左室自由壁厚 (LVPWs) を測定した。

パルスドプラ法は左側横臥位にて、左室流入波形において拡張早期波 (E 波)、心房収縮期波 (A 波)、E 波と A 波の比 (E/A) および E 波減速時間 (DecT) を測定した。また、心尖部五腔断面においてサンプルボリュームを大動脈弁直下に置き、左室流出路断面積 (CSA)、大動脈血流速 (AEV)、流速積分値 (TVI) を測定し、1 回拍出量 (SV) [42] および心拍出量 (CO) を計測した。CO は  $SV \times HR$  として算出した。さらに、四腔断面での左室流入血流終了から再流入開始までの時間を a 時間、心尖部五腔断面像による左室駆出血流の開始から終了までを b 時間として、 $Tei\ index = (a - b) / b$  にて左室 Tei index を求めた [21]。同様に右室 Tei index も、三尖弁流入血流終了から再流入開

始までの時間と心基部短軸像による右室駆出血流開始から終了までを求めて測定した [21]。

組織ドプラ法では、心尖部四腔像における僧帽弁輪部中隔側にサンプルボリュームを置き、僧帽弁輪部運動速波形から拡張早期波 (Em) と心房収縮期波 (Am) を測定し、Em と Am の比 (Em/Am) を求めた。また、左室流入波形での E 波と Em との比 (E/Em) も求めた。左室短軸像では左室後壁の心内膜側の速度 (Vend) と心外膜側の速度 (Vepi) を計測し、その差を 2 点間の距離で除することにより心筋速度勾配 (MVG) を算出した [43]。MVG は収縮中期 (MVGs)、拡張早期 (MVGe)、心房収縮期 (MVGa) にてそれぞれ計測した。

各心エコーパラメータの測定は、少なくとも 3 回繰り返し行い、そしてその平均値をデータに採用した。

### 統計分析

統計解析は、市販のソフトウェア (StatMate3、ATMS、東京、日本) で行った。血液生化学、心エコーおよび血行循環変数は平均 ± 標準誤差で表した。PS 投与による経時的な変化は一元配置分散分析法を行った後、Tukey の多重比較検定を用いて解析した。Cont 群と PS 投与群との各時点での比較は Student's *t*-test を用いて行った。全ての試験の統計は  $P < 0.05$  を有意と判定した。

## 結果

### 各種循環パラメータ

HR、LA/Ao、FS および EF の推移は図 1 に示した。HR は Cont 群と比べ PS 2 群にて低下傾向がみられたが、群間において有意差はなかった(図 1A)。LA/Ao はベースラインと比べ低下傾向であったが有意差はなく、Cont 群と比べ PS 0.5 と PS 2 群では 1 週で、PS 1 群では 4 週で有意に低下した(図 1B)。FS および EF は PS 投与後低下傾向を示したが有意差はなかった。Cont 群との比較は PS 0.5 群は 2 週と 4 週で、PS 1 群では 1 週で、PS 2 群では各週にて有意に低下した(図 1C、D)。FS および EF は低用量よりも高用量のほうが早く有意差があらわれた。IVSd、LVIDd、LVPWd、IVSs、LVIDs および LVPWs はベースラインと Cont 群の比較とも有意差はなかった。

E 波、A 波、E/A、DecT および E/Em の変化は表 8 に示した。E 波はベースラインおよび Cont 群の比較とも PS 2 群 4 週後に有意に低下した。A 波はいずれの比較においても有意差はなかった。E/A はベースラインと比べ PS 1 群の 2 週で有意に低下し、Cont 群との比較では PS 群で低下傾向を示したが、有意差はなかった。DecT はベースラインと比べ PS 0.5 群と 2 群の 1、2 および 4 週後で有意に上昇した。これに対して E/Em はベースラインと



比べ PS 2 群 4 週後に有意に低下した。Cont 群との比較は、PS 1 と 2 群の 4 週後に有意に低下した。

左室と右室の Tei index は図 2 に示した。左室 Tei index はベースラインと比べ PS 1 群 4 週後に有意に低下した。Cont 群との比較は全ての PS 投与群において有意に低下した。右室 Tei index はベースラインと比べ低下傾向を示したが、有意差はなく、Cont 群との比較では PS 1 群の 2 週後に有意に低下した。

Em、Am、Em/Am、MVGs、MVGe および MVGa の組織ドプラ変化は表 9 に示した。Em はベースラインと比べ有意差はなく、Cont 群と比べて PS 1 群の 4 週後で有意に上昇した。Am と Em/Am は、いずれの群においても有意差はなかった。MVGs は、ベースラインと比べ全ての PS 投与群の 1 週または 4 週後に有意に低下し、Cont 群との比較は PS 1 群の 4 週後で有意に低下した。MVGe はベースラインと比べ、全ての PS 投与群において上昇傾向であったが、有意差はなかった。Cont 群との比較は全ての PS 投与群において 1、2 または 4 週後で有意に上昇した。MVGa はいずれの群においても PS 投与後の有意差はなかった。

AEV、VTI、CO、SV および MBP の変化は表 10 に示した。AEV はベースラインと比べ PS 0.5 群の 2 週後に有意に低下し、Cont 群との比較は全ての PS 投与群にて 2 または 4 週後で有意に低下した。VTI はベースラインと

比べ PS 1 群の各週にて有意に低下した。Cont 群との比較は全ての PS 投与群で 1、2 または 4 週後にて VTI が有意に低下した。CO と SV もまたベースラインと比べ減少傾向を示したが、有意差は認められなかった。Cont 群との比較は全ての PS 投与群で 1、2 または 4 週後にて CO と SV の有意な減少が認められた。PS 投与群の MBP はベースラインと比べ低下傾向を示したが、有意差はなかった。Cont 群との比較は PS 1 群 2 週後にて MBP の有意な低下がみられた。

#### 血液検査と血液生化学検査

NT-proBNP 濃度、ANP 濃度、NO 濃度および TCHO 濃度は表 11 に示した。NT-proBNP と ANP 値はいずれの PS 投与群においても有意差はなく、基準範囲内の変動であった。NO 値は PS 投与によりベースラインと比べ顕著に上昇しているところもあるが、ばらつきが大きく有意差はなかった。TCHO 濃度はベースラインと比べ有意差はなく、Cont 群と比べ PS 2 群にて低下傾向を示したが有意差はなかった。

HDLC 濃度、LDLC 濃度、TG 濃度、CPK 活性、BUN 濃度、CRE 濃度、AST 活性、ALT 活性、ALP 活性および IP 濃度はいずれの PS 投与群においても有意差はなかった。PCV 値、WBC 数、PLT 数、Na 濃度、K 濃度および Cl 濃度もまた、いずれの PS 投与群において有意差は認めら

れなかった。全ての PS 投与群において、活動不耐性や疼痛症状などの有害反応はみられなかった。

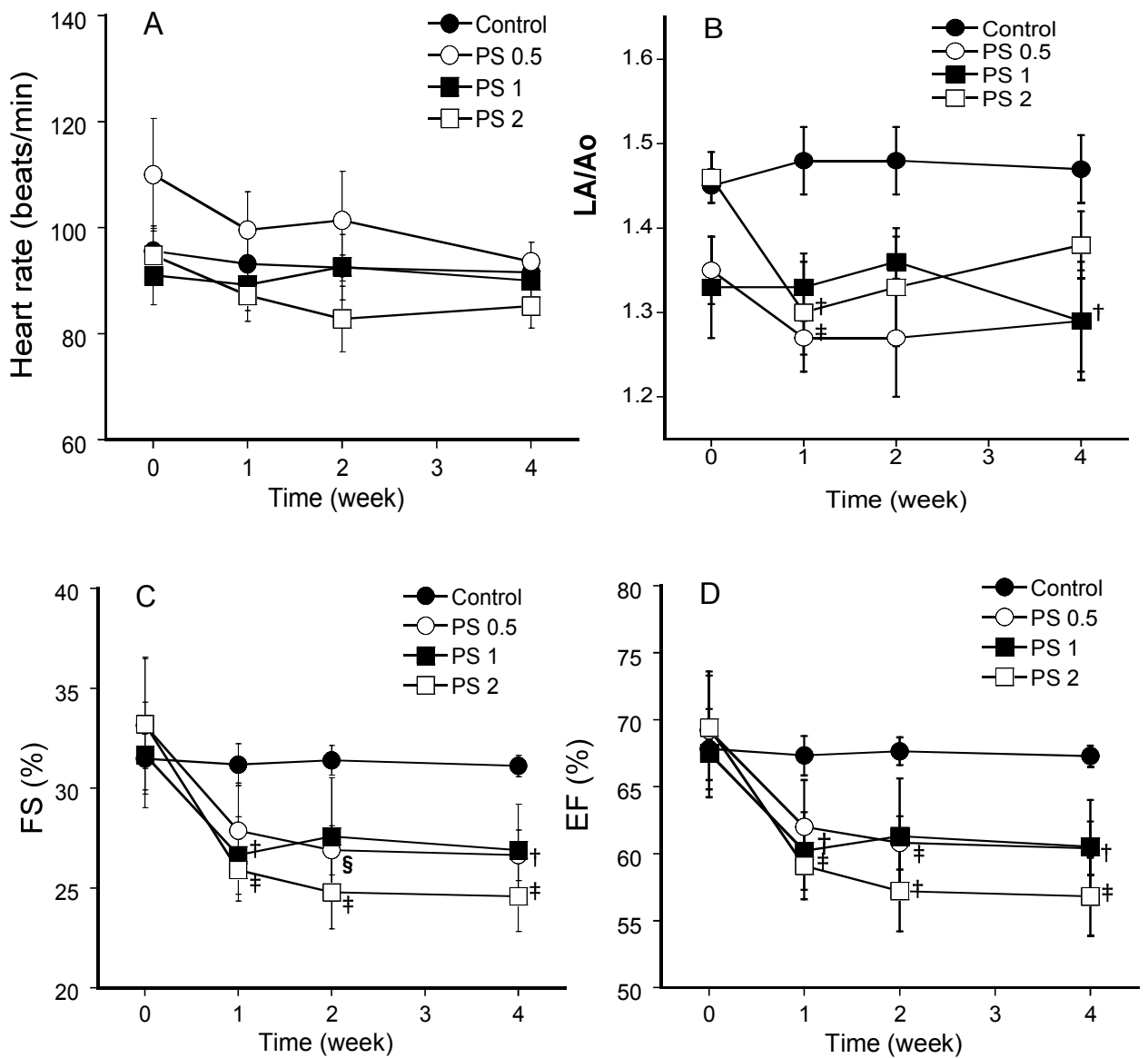


図1. プラバスタチン投与後の変化 平均±標準誤差 (n=5)  
 heart rate: 心拍数(A), LA/Ao: 左心房大動脈径比(B), FS: 左室内径短縮率(C), EF: 左室駆出率(D). PS 0.5, 1, and 2 = プラバスタチン 0.5, 1, and 2 mg/kg.  
 \* $P < 0.05$ , ベースライン(time 0)値と比べ有意差あり, † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$ , and § $P < 0.001$ , コントロール群と比べ有意差あり

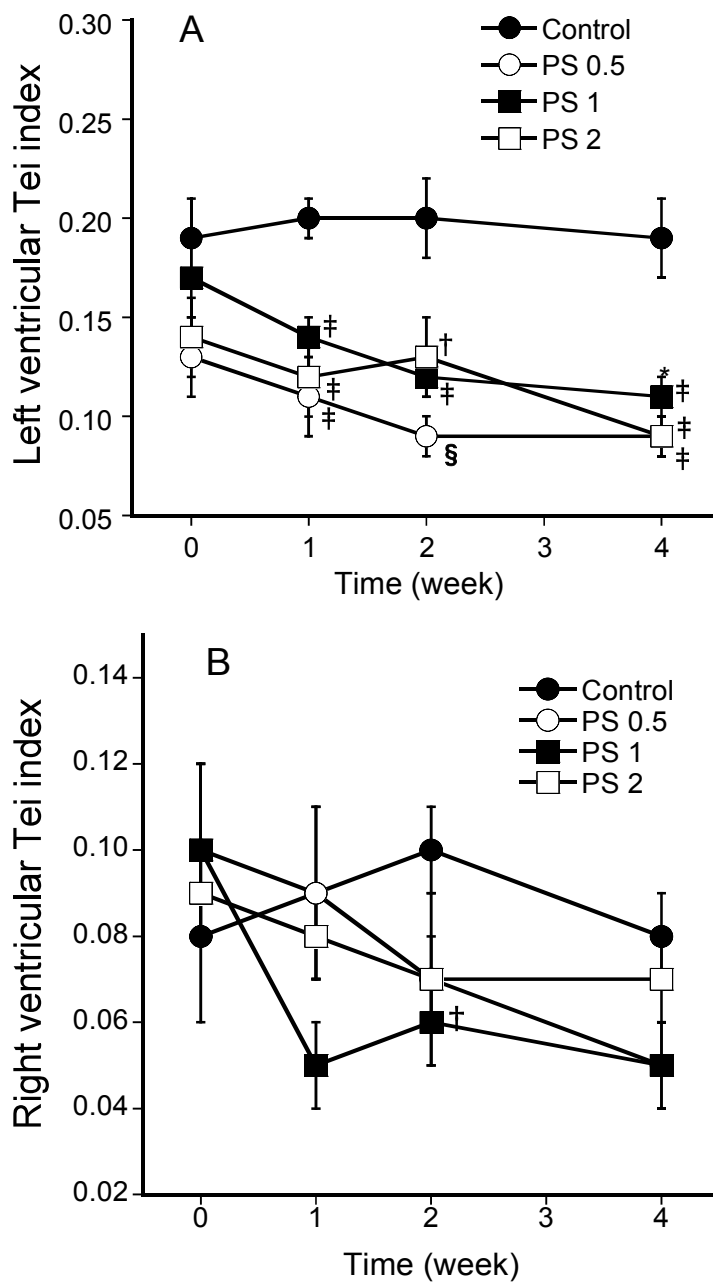


図2. プラバスタチン投与後の変化 平均±標準誤差 (n=5)  
 left ventricular Tei index: 左室 Tei index (A), right ventricular Tei index: 右室 Tei index (B). PS 0.5, 1, and 2 = プラバスタチン 0.5, 1, and 2 mg/kg. \* $P < 0.05$ , ベースライン (time 0) と比べ有意差あり, † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$ , and § $P < 0.001$ , コントロール群と比べ有意差あり

表 8. プラバスタチン投与後の E 波、A 波、E/A、DecT および E/Em の変化

| 測定項目       | 群       | プラバスタチン投与後 (週) |             |              |              |
|------------|---------|----------------|-------------|--------------|--------------|
|            |         | 0              | 1           | 2            | 4            |
| E 波 (cm/s) | Control | 65.3 ± 3.0     | 64.6 ± 3.7  | 65.4 ± 4.1   | 63.3 ± 3.0   |
|            | PS 0.5  | 68.0 ± 2.9     | 66.8 ± 2.9  | 62.2 ± 2.2   | 61.7 ± 2.6   |
|            | PS 1    | 67.3 ± 1.9     | 60.1 ± 2.7  | 62.1 ± 2.4   | 63.0 ± 2.2   |
|            | PS 2    | 73.0 ± 2.8     | 64.3 ± 2.5  | 64.5 ± 1.7   | 58.6 ± 3.2*† |
| A 波 (cm/s) | Control | 40.5 ± 1.4     | 45.5 ± 3.7  | 40.0 ± 4.5   | 42.3 ± 2.6   |
|            | PS 0.5  | 39.9 ± 2.8     | 49.2 ± 2.8  | 38.3 ± 4.2   | 39.4 ± 3.3   |
|            | PS 1    | 32.8 ± 1.8     | 40.9 ± 4.2  | 44.3 ± 2.9   | 43.8 ± 5.7   |
|            | PS 2    | 37.5 ± 4.5     | 42.3 ± 3.3  | 44.9 ± 3.0   | 41.3 ± 3.4   |
| E/A        | Control | 1.61 ± 0.05    | 1.44 ± 0.09 | 1.67 ± 0.10  | 1.50 ± 0.07  |
|            | PS 0.5  | 1.74 ± 0.13    | 1.37 ± 0.05 | 1.69 ± 0.16  | 1.60 ± 0.11  |
|            | PS 1    | 2.12 ± 0.18    | 1.53 ± 0.15 | 1.42 ± 0.09* | 1.53 ± 0.17  |
|            | PS 2    | 2.09 ± 0.30    | 1.56 ± 0.14 | 1.46 ± 0.07  | 1.44 ± 0.12  |
| DecT (ms)  | Control | 93.6 ± 4.5     | 90.0 ± 4.2  | 86.4 ± 6.2   | 90.0 ± 3.3   |
|            | PS 0.5  | 80.4 ± 5.6     | 98.4 ± 3.1* | 97.2 ± 2.2*  | 91.2 ± 3.5   |
|            | PS 1    | 76.8 ± 5.8     | 88.8 ± 5.2  | 91.2 ± 3.5   | 96.0 ± 7.3   |
|            | PS 2    | 78.0 ± 4.4     | 92.4 ± 5.9  | 92.4 ± 4.1   | 104.4 ± 7.2* |
| E/Em       | Control | 8.1 ± 0.4      | 8.1 ± 0.5   | 8.2 ± 0.4    | 8.2 ± 0.3    |
|            | PS 0.5  | 8.3 ± 0.5      | 8.2 ± 0.4   | 7.5 ± 0.3    | 7.7 ± 0.4    |
|            | PS 1    | 9.1 ± 0.6      | 7.2 ± 0.5   | 7.6 ± 0.6    | 7.5 ± 0.2†   |
|            | PS 2    | 9.7 ± 0.4      | 8.3 ± 0.4   | 8.2 ± 0.3    | 7.5 ± 0.5*†  |

平均 ± 標準誤差 (n=5) E 波: 拡張早期波, A 波: 心房収縮期波, DecT: E 波減速時間.  
 PS 0.5, 1, and 2 = プラバスタチン 0.5, 1, and 2 mg/kg. \* $P < 0.05$ , ベースライン(time 0) 値と比べ有意差あり, † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$ , and § $P < 0.001$ , コントロール群と比べ有意差あり

表9. プラバスタチン投与後の組織ドプラ法による変化

| 測定項目      | 群       | プラバスタチン投与後 (週) |               |               |               |
|-----------|---------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|           |         | 0              | 1             | 2             | 4             |
| Em (cm/s) | Control | 8.1 ± 0.2      | 7.9 ± 0.2     | 7.9 ± 0.1     | 7.7 ± 0.2     |
|           | PS 0.5  | 8.3 ± 0.3      | 8.2 ± 0.4     | 8.3 ± 0.4     | 8.1 ± 0.4     |
|           | PS 1    | 7.5 ± 0.4      | 8.4 ± 0.5     | 8.3 ± 0.4     | 8.4 ± 0.3†    |
|           | PS 2    | 7.5 ± 0.4      | 7.8 ± 0.3     | 7.9 ± 0.3     | 7.8 ± 0.2     |
| Am (cm/s) | Control | 5.5 ± 0.3      | 5.5 ± 0.3     | 5.5 ± 0.3     | 5.5 ± 0.2     |
|           | PS 0.5  | 5.2 ± 0.5      | 5.4 ± 0.5     | 5.6 ± 0.4     | 5.4 ± 0.4     |
|           | PS 1    | 4.3 ± 0.5      | 5.5 ± 0.6     | 5.6 ± 0.2     | 6.0 ± 0.6     |
|           | PS 2    | 4.5 ± 0.6      | 5.5 ± 0.4     | 5.3 ± 0.7     | 5.2 ± 0.5     |
| Em/Am     | Control | 1.49 ± 0.07    | 1.43 ± 0.8    | 1.44 ± 0.07   | 1.41 ± 0.07   |
|           | PS 0.5  | 1.64 ± 0.13    | 1.58 ± 0.18   | 1.52 ± 0.14   | 1.50 ± 0.07   |
|           | PS 1    | 1.80 ± 0.15    | 1.58 ± 0.14   | 1.48 ± 0.02   | 1.43 ± 0.09   |
|           | PS 2    | 1.75 ± 0.15    | 1.44 ± 0.09   | 1.57 ± 0.15   | 1.54 ± 1.13   |
| MVGs (s)  | Control | 1.76 ± 0.13    | 1.74 ± 0.13   | 1.78 ± 0.15   | 1.80 ± 0.10   |
|           | PS 0.5  | 2.30 ± 0.19    | 1.51 ± 0.26*  | 1.59 ± 0.19   | 1.52 ± 0.16*  |
|           | PS 1    | 2.09 ± 0.26    | 1.73 ± 0.06   | 1.46 ± 0.19   | 1.22 ± 0.18*† |
|           | PS 2    | 2.19 ± 0.15    | 1.78 ± 0.11   | 1.70 ± 0.06   | 1.66 ± 0.14*  |
| MVGe (s)  | Control | -1.73 ± 0.10   | -1.61 ± 0.12  | -1.68 ± 0.19  | -1.68 ± 0.15  |
|           | PS 0.5  | -1.51 ± 0.19   | -1.99 ± 0.10† | -2.06 ± 0.23  | -2.19 ± 0.27  |
|           | PS 1    | -1.35 ± 0.20   | -2.22 ± 0.23† | -2.36 ± 0.52  | -2.62 ± 0.23‡ |
|           | PS 2    | -1.69 ± 0.29   | -2.37 ± 0.24† | -2.69 ± 0.30† | -2.33 ± 0.20† |
| MVGa (s)  | Control | -1.03 ± 0.17   | -0.97 ± 0.16  | -1.11 ± 0.08  | -1.18 ± 0.23  |
|           | PS 0.5  | -0.64 ± 0.52   | -0.40 ± 0.85  | -1.08 ± 0.16  | -0.92 ± 0.20  |
|           | PS 1    | -1.15 ± 0.12   | -1.44 ± 0.29  | -1.19 ± 0.10  | -0.69 ± 0.44  |
|           | PS 2    | -1.14 ± 0.44   | -1.89 ± 0.28  | -1.48 ± 0.37  | -1.30 ± 0.49  |

平均±標準誤差 (n=5) Em: 僧帽弁輪部運動速波形拡張早期波, Am: 僧帽弁輪部運動速波形心房収縮期波, MVGs: 収縮中期心筋速度勾配, MVGe: 拡張早期心筋速度勾配, MVGa: 心房収縮期心筋速度勾配. PS 0.5, 1, and 2 = プラバスタチン 0.5, 1, and 2 mg/kg. \* $P < 0.05$ , ベースライン(time 0)値と比べ有意差あり, † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$ , and § $P < 0.001$ , コントロール群と比べ有意差あり

表 10. プラバスタチン投与後の AEV, VTI, CO, SV および MBP の変化

| 測定項目       | 群       | プラバスタチン投与後 (週) |            |            |            |
|------------|---------|----------------|------------|------------|------------|
|            |         | 0              | 1          | 2          | 4          |
| AEV (cm/s) | Control | 81.8±5.6       | 74.3±4.2   | 81.5±2.2   | 76.9±3.8   |
|            | PS 0.5  | 85.5±4.4       | 72.3±2.8   | 67.5±3.6*† | 69.8±4.9   |
|            | PS 1    | 77.4±1.5       | 67.1±1.8   | 70.8±2.8†  | 68.3±3.8†  |
|            | PS 2    | 77.9±6.3       | 67.1±5.3   | 66.6±3.2‡  | 66.9±3.7†  |
| VTI (cm)   | Control | 9.8±0.5        | 9.8±0.3    | 10.6±0.3   | 9.7±0.4    |
|            | PS 0.5  | 9.3±0.7        | 8.3±0.7†   | 8.5±0.4‡   | 8.7±0.6    |
|            | PS 1    | 8.9±0.2        | 7.7±0.3*‡  | 7.7±0.3*§  | 7.6±0.2*‡  |
|            | PS 2    | 9.1±0.5        | 8.1±0.5†   | 7.9±0.6‡   | 7.9±0.5†   |
| CO (l/min) | Control | 0.90±0.07      | 0.85±0.06  | 0.85±0.06  | 0.86±0.04  |
|            | PS 0.5  | 0.92±0.10      | 0.76±0.08  | 0.73±0.10  | 0.74±0.05† |
|            | PS 1    | 0.74±0.12      | 0.62±0.06† | 0.66±0.08† | 0.62±0.04§ |
|            | PS 2    | 0.80±0.12      | 0.70±0.08  | 0.65±0.07† | 0.65±0.09† |
| SV (ml)    | Control | 11.4±0.5       | 11.2±0.5   | 12.4±0.4   | 11.2±0.6   |
|            | PS 0.5  | 9.6±0.7        | 8.2±0.7§   | 8.7±0.8‡   | 9.0±0.7‡   |
|            | PS 1    | 9.4±0.6        | 8.0±0.6§   | 8.0±0.4§   | 7.7±0.2§   |
|            | PS 2    | 9.5±0.8        | 8.3±0.7†   | 8.3±1.0‡   | 7.8±0.9†   |
| MBP (mmHg) | Control | 80±2           | 82±2       | 85±3       | 82±4       |
|            | PS 0.5  | 103±12         | 95±4       | 85±3       | 84±5       |
|            | PS 1    | 92±5           | 78±3       | 78±3†      | 81±3       |
|            | PS 2    | 81±3           | 75±4       | 80±4       | 81±5       |

平均±標準誤差 (n=5) AEV: 大動脈血流速, VTI: 左室駆出血流時間速度積分値, CO: 心拍出量, SV: 1回拍出量, MBP: 平均血圧. PS 0.5, 1, and 2 = プラバスタチン 0.5, 1, and 2 mg/kg. \* $P < 0.05$ , ベースライン(time 0)値と比べ有意差あり, † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$ , and § $P < 0.001$ , コントロール群と比べ有意差あり



表 11. プラバスタチン投与後の血液生化学の変化

| 測定項目                | 群       | プラバスタチン投与後 (週) |             |             |             |
|---------------------|---------|----------------|-------------|-------------|-------------|
|                     |         | 0              | 1           | 2           | 4           |
| NT-pro BNP (pmol/l) | Control | 367 ± 60       | 343 ± 76    | 352 ± 64    | 450 ± 76    |
|                     | PS 0.5  | 218 ± 30       | 247 ± 27    | 280 ± 32    | 250 ± 50    |
|                     | PS 1    | 259 ± 18       | 179 ± 50    | 280 ± 38    | 311 ± 44    |
|                     | PS 2    | 260 ± 18       | 340 ± 52    | 249 ± 38    | 238 ± 45    |
| ANP (pg/ml)         | Control | 19.2 ± 3.4     | 18.1 ± 3.0  | 17.2 ± 2.9  | 19.9 ± 3.3  |
|                     | PS 0.5  | 36.0 ± 10.1    | 28.3 ± 3.9  | 39.9 ± 8.0  | 40.1 ± 10.8 |
|                     | PS 1    | 29.4 ± 5.0     | 39.0 ± 11.8 | 41.6 ± 10.7 | 30.8 ± 5.5  |
|                     | PS 2    | 26.0 ± 5.5     | 24.1 ± 3.0  | 32.5 ± 3.4  | 20.9 ± 3.0  |
| NO (μmol/l)         | Control | 29.3 ± 5.0     | 33.3 ± 4.3  | 39.4 ± 3.9  | 37.0 ± 6.4  |
|                     | PS 0.5  | 36.3 ± 4.3     | 29.6 ± 5.0  | 45.1 ± 11.4 | 29.9 ± 5.8  |
|                     | PS 1    | 29.6 ± 3.9     | 28.7 ± 7.2  | 26.8 ± 2.9  | 67.8 ± 41.3 |
|                     | PS 2    | 31.6 ± 4.5     | 48.5 ± 12.1 | 28.6 ± 4.3  | 47.2 ± 7.7  |
| TCHO (mg/dl)        | Control | 232 ± 25       | 223 ± 23    | 213 ± 22    | 238 ± 19    |
|                     | PS 0.5  | 229 ± 22       | 228 ± 18    | 243 ± 18    | 248 ± 22    |
|                     | PS 1    | 251 ± 26       | 239 ± 25    | 237 ± 22    | 247 ± 25    |
|                     | PS 2    | 232 ± 26       | 220 ± 34    | 210 ± 25    | 219 ± 30    |

平均±標準誤差 (n=5) NO: 一酸化窒素, TCHO: 総コレステロール. PS 0.5, 1, and 2 = プラバスタチン 0.5, 1, and 2 mg/kg.

## 考察

スタチン系薬剤は大きく2つに分けると水溶性スタチン、脂溶性スタチンに分類される。心筋梗塞時虚血に曝された心筋では、虚血が解消されても直ぐに元に戻らないスタニング現象: *Stunned myocardium* が起こり、心筋収縮力の回復を遅らせることが知られている[72]。Ichiharaら[73]は、水溶性スタチンであるPS投与群と脂溶性スタチンであるシンバスタチン投与群とを比較するためにビーグル犬を用い、それぞれ2 mg/kg、3週間の経口投与を行った。次に、麻酔開胸下にて左冠動脈前下行枝を結紮した。結紮解除の再灌流後、PS群は心筋ATP含有量を低下させず、心筋収縮力の回復に影響を及ぼさなかった。しかし、シンバスタチン群は心筋ATP含有量が有意に低下し、心筋収縮力の回復を遅らせたと報告されている。このことから、脂溶性スタチンは心筋に悪影響が出る可能性があるため、筆者は水溶性スタチンであるPSに注目し、本研究の投薬量においても2 mg/kg/日を上限とした。また、投与期間はスタチンを使用した人の臨床試験を参考にした[74]。

本研究にて健康犬へのPS投与は、LA/Ao、E波およびE/Emを低下させ、EmとMVGeを上昇させることが分かった。人医領域においてEmは拡張早期の左室弛緩能を反映する。前負荷の影響を受けにくく、E波のように偽

正常化することなく左室拡張障害の重症化にともなって減少する[75]。獣医領域でも  $E_m$  は拡張能と相関関係にある[76]。 $E/E_m$  は人医領域と獣医領域両方において、左房圧や左室充満圧を推定するよい指標であると報告されている[77,78]。したがって本研究でみとめられた PS による  $E/E_m$  の低下、 $E_m$  と  $MVGe$  の上昇は左室拡張能の亢進を示したと考えられる。この左室弛緩作用は、 $Ang II$  によって誘発された高血圧マウスにおいて左室拡張能を改善させた報告と一致した[79]。この原因は Brunner ら[80]が報告した eNOS 由来 NO による心筋弛緩作用による可能性がある。しかしながら、本研究における PS 治療後の血清 NO 値の有意差はなかった。血清 NO 値の有意差はなかったものの、細胞レベルでは違いが生じていた可能性があるかもしれない。また、PS のコレステロール合成経路を阻害することは低分子量 G タンパク質の Ras、Rho および Rac の活性化を抑制し、心筋リモデリング抑制作用を起こすことが知られている[13]。従って、このことも心筋弛緩作用が認められた要因のひとつと思われた。

一方、 $LA/Ao$ 、E 波および  $E/E_m$  の低下は左房圧の低下を示唆する。この効果に関しては、eNOS 由来 NO を通して血管を拡張させ[81]、拡張した静脈と動脈は前負荷と後負荷を減少させ、左房圧を低下させたと推察された。加えて、PS の Rho キナーゼ抑制効果による血管拡張作用

[82]および PS の Ang II 減少効果 [58]も左房圧を低下させた要因のひとつと思われた。さらにまた、本研究にて健康犬への PS 投与は FS、EF、MVGs および CO を低下させた。この陰性変力作用も eNOS 由来 NO によるものと推察された [83]。また、本研究では HR は有意な変化を示さなかったため、CO の減少は SV の減少に起因すると考えられた。

自然発症高血圧ラットにおいて PS 投与は HR を低下せたと報告されている [58]。本研究では有意差はなかったが、Cont 群と比べて高用量にて低下傾向を示した。この結果から PS 投与は、少なくとも交感神経活性を亢進させることはないと推察される。

僧帽弁閉鎖不全症 (MR) 犬において、LA/Ao と E 波は心不全予後評価因子として有用であり、重症度に応じて上昇する [51]。また、MR 犬はその病態から左房圧の上昇を抑えることが重要である。従って、本研究による PS 投与後の LA/Ao、E 波および E/Em の低下と Em の上昇は左房圧低下を示唆し、MR 犬治療に有効である可能性がある。しかし、本研究における PS 投与後の FS、EF および CO の減少は心不全の悪化を危惧するかもしれない。これについては、本研究では健康犬を使用しているが、実際の心不全犬ではレニン・アンジオテンシン系活性化の亢進により後負荷の増大が考えられる。従って、PS の動脈拡張作用による後負荷の軽減は心筋収縮を容易にし、FS、

EF および CO の増加をもたらし、心不全を改善させる可能性がある。また、MR 犬への PS 使用時期とすれば末期状態ではなく、ISACHC II および ACVIM ステージ C が推奨されると思われる。なお、Cont 群に対して LA/Ao の低下は PS 0.5 mg/kg の投与量から有意差がみられたが、左房圧低下や左室拡張能亢進を示唆する E/Em 低下および Em 上昇効果には PS 1 mg/kg 以上の投与量が必要であった。加えて、総合的な心機能を反映する右室と左室 Tei index は PS 投与後低下した。このことは PS 投与が左心不全、右心不全にも効果的である可能性を示唆した。また、犬において高脂血症を示す代表的な疾患として、副腎皮質機能亢進症あるいは甲状腺機能低下症があり、心疾患のリスクが増大する可能性がある [84,85]。PS はこれらの疾患における心不全の合併症を減らすことができるかもしれない。

心不全犬において ANP 値と NT-proBNP 値は上昇する [52,86]。本研究では ANP 値と NT-proBNP 値の上昇はなく、正常範囲内の変動であった。このことは、健康犬への PS 投与による心房負荷や心筋負荷はなかったと示唆され、心エコー所見と一致した。一方、人においてスタチンの副作用として横紋筋融解症が報告されているが [87]、本研究では PS による疼痛を暗示する異常行動や血漿 CPK 値の上昇などはなかった。また、4 週間の PS 投与期間中に腎臓や肝臓病を暗示する血液学的小および血液

生化学的な異常も観察されなかった。このことから、0.5～2 mg/kg/日のPS投与は、犬に対して明らかな副作用がなく、安全に使用できると考えられた。

本研究の心エコーと血行力学パラメータから、健康犬へのPS投与は左室拡張能亢進作用、左室収縮力の減少作用および左房圧低下作用を示すことが分かった。従って、PS投与は左室拡張不全や左房圧上昇した心不全犬に有効と思われる。本研究は筆者の知る限り、PSによる犬の血行循環パラメータを調査した最初の報告である。

## 第 4 章

犬の僧帽弁閉鎖不全症に対する  
プラバスタチンの効果

## 緒言

スタチンは3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム A (HMG-CoA)還元酵素阻害薬であり、コレステロール合成経路であるメバロン酸経路において HMG-CoA還元酵素を阻害することにより血中コレステロール値を低下させる薬剤である [13]。スタチンはこのコレステロール低下作用以外にもレニン・アンジオテンシン系の抑制作用や抗炎症作用および抗酸化作用が報告されており [13]、人医領域では心不全改善効果が期待されている。その作用機序は HMG-CoA還元酵素を阻害することにより、コレステロール合成経路のファルネシルピロリン酸などの中間代謝産物を抑制することで、コレステロール低下に依存しない多面的効果を有する [13]。さらに、スタチンはメバロン酸経路を抑制することにより PI3キナーゼ Akt 経路を活性化させる [13]。その結果、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を活性化させ、一酸化窒素 (NO) の産生を増加させる [70]。

スタチンの中でプラバスタチン (PS) は、人心筋細胞での NO 産生増加とエンドセリン-1 (ET1) 産生を減少させ心筋保護効果を示した [88]。自然発症高血圧ラットにおいては、PS 投与により心臓アンジオテンシン II 発現レベルを減少させた [58]。加えて、マウスの圧負荷実験では心臓リモデリングを抑制したと報告されている [57]。人



医領域では、PSは冠動脈心疾患を予防し[55]、心臓移植患者の予後を改善する効果が認められ[89]、心房細動にも効果的であったと報告されている[64]。これら基礎実験や人の臨床試験から、PSの循環器に及ぼす多面的効果が示唆されている。

一方、犬の循環器疾患におけるPSの及ぼす影響は分かっていない。そこで本研究は、犬の僧帽弁閉鎖不全症(MR)に対するPSの治療効果を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 供試動物

ISACHC II および ACVIM ステージ C を呈した MR 犬 12 症例を用いた。全頭とも既に MR 治療中で、ランダムにコントロール (Cont) 群 7 頭 (PS 非投与群) と PS 群 5 頭の 2 群に振り分けた。犬種、年齢、性別、体重、三尖弁閉鎖不全症 (TR) および肺高血圧症 (PH) の併発、併用薬を表 12 に示した。

### 薬剤投与

治療薬は表 12 に示した薬剤を投与しており、PS 群ではこれまでの治療薬に加えて、PS (プラバスタチン Na 塩錠、田辺三菱製薬(株)、大阪) 1 mg/kg を 1 日 1 回で 4 週間、毎日、経口投与した。PS 投薬前と投薬 4 週間後には

一般身体検査、一般血液検査、血液生化学検査、血圧測定および心エコー検査を実施した。

### 血液生化学検査

血中尿素窒素 (BUN) 濃度、クレアチニン (CRE) 濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性、総ビリルビン (TBIL) 濃度、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) 活性、無機リン (IP) 濃度、総コレステロール (TCHO) 濃度、トリグリセライド (TG) 濃度は、ドライケミストリー法 (富士ドライケム 3500V、富士フィルムメディカル(株)、東京) にて測定した。血漿ナトリウム (Na)、血漿カリウム (K) および血漿クロール (Cl) 濃度は、(富士ドライケム 800V、富士フィルムメディカル(株)、東京) にて測定した。血清の脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント (NT-proBNP) 濃度は、アイデックスラボラトリーズ(株)(東京) にてマイクロプレート ELISA 法で測定した。心房性ナトリウム利尿ポリペプチド (ANP) 濃度は、福山臨床検査センター(株) (広島) にて CLEIA 法で測定した。高比重リポ蛋白コレステロール (HDL-C) 濃度と低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) 濃度は、モノリス(株)(東京) にて酵素法で測定した。尚、ANP 濃度、HDL-C および LDL-C 濃度は PS 群のみ測定した。

### 心臓超音波検査と各種循環パラメータ

平均血圧 (MBP) は、全自動電子血圧計 (ダイナマップ 8300、CRITIKON、U.S.A.) を用い、オシロメトリック法にて測定した。心エコー検査は超音波機器 (Prosound α7、日立アロカメディカル (株)、東京) を用いて、心拍数 (HR) は心エコーによる心電図にて測定した。Mモード法は右横臥位にて左室長軸流出路像から左心房/大動脈径比 (LA/Ao) を測定した。左室短軸像から左室内径短縮率 (FS) [20]、左室駆出率 (EF) [20]、拡張末期中隔壁厚 (IVSd)、拡張末期左室内径 (LVIDd)、拡張末期左室自由壁厚 (LVPWd)、収縮末期中隔壁厚 (IVSs)、収縮末期左室内径 (LVIDs)、収縮末期左室自由壁厚 (LVPWs) を測定した。

パルスドプラ法は左側横臥位にて、左室流入波形において拡張早期波 (E波)、心房収縮期波 (A波)、E波とA波の比 (E/A)、E波減速時間 (DecT) を測定した。また、心尖部五腔断面においてサンプルボリュームを大動脈弁直下に置き、左室流出路断面積 (CSA)、大動脈血流速 (AEV)、流速積分値 (TVI) を測定し、1回拍出量 (SV) [42] および心拍出量 (CO) を計測した。CO は  $SV \times HR$  として算出した。さらに、四腔断面での左室流入血流終了から再流入開始までの時間を a 時間、心尖部五腔断面像による左室駆出血流の開始から終了までを b 時間として、 $Tei\ index = (a - b) / b$  にて左室 Tei index を求めた [21]。同様に右室 Tei index も、三尖弁流入血流終了から再流入開始までの時

間と心基部短軸像による右室駆出血流開始から終了までを求めて測定した [21]。

連続波ドプラ法を用いて、四腔断面にて収縮期僧帽弁最高逆流速 (MRmax)、収縮期三尖弁最高逆流速 (TRmax) を測定した。収縮期肺動脈圧 (sPA) は、簡易ベルヌーイ式を用いて  $4 \times (\text{TRmax})^2$  から圧較差を求め [22]、この値に推定右房圧の 10 mmHg を加算して算出し、sPA が 30 mmHg 以上で PH とした [6]。

組織ドプラ法では、心尖部四腔像における僧帽弁輪部中隔側にサンプルボリュームを置き、僧帽弁輪部運動速波形から拡張早期波 (Em) と心房収縮期波 (Am) を測定し、Em と Am の比 (Em/Am) を求めた。また、左室流入波形での E 波と Em との比 (E/Em) も求めた。左室短軸像では左室後壁の心内膜側の速度 (Vend) と心外膜側の速度 (Vepi) を計測し、その差を 2 点間の距離で除することにより心筋速度勾配 (MVG) を算出した [43]。MVG は収縮中期 (MVGs)、拡張早期 (MVGe)、心房収縮期 (MVGa) にてそれぞれ計測した。各心エコーパラメータの測定は、少なくとも 3 回繰り返し行い、その平均値をデータに採用した。

## 統計分析

各データを平均 ± 標準偏差で示し、PS 群は PS 投与直前値を Pre、PS 投与 4 週間後を Post とした。各群とも Pre と Post 間の比較は Paired *t*-test にて検定し、両群におけ

る Post 値は Student's *t*-test にて解析を行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 結果

PS 治療中に腎・肝機能などの血液検査異常や副作用は確認されず、両群とも心不全症状の改善がみられた。各種循環パラメータの測定値は表 13 に示した。MBP、HR および LA/Ao は両群とも Pre と Post 間の有意差は認められなかった。FS、EF は両群とも Pre に対して有意に増加した。LVIDd は Cont 群では有意差が認められなかったが、PS 群では Pre に対し有意に減少した。LVIDs は両群とも Pre に対し有意に減少した。IVSd、LVPWd、IVSs および LVPWs は両群とも Pre と比べ有意差はなかった。

E 波、A 波および E/A は、両群とも Pre に対して有意差はなかった。DecT は Cont 群では有意差はなく、PS 群では Pre に対して有意に上昇した。CO と SV は両群とも Pre に対し有意に上昇し、CO は Cont 群の Post に対しても有意な上昇を示した。左室 Tei index は両群とも Pre と比べ有意に低下し、右室 Tei index は両群とも有意差はなかった。

MRmax は両群とも Pre に対して有意差はなく、TRmax と sPA は Cont 群では有意差はなかったが、PS 群では Pre と比べ有意に減少した。

Em は Cont 群では有意差はなく、PS 群では Pre と比べ有意に上昇した。Am と Em/Am は両群とも Pre に対して有意差はなかった。MVGe は Cont 群では有意差はなく PS 群では Pre と比べ有意に上昇した。MVGs と MVGa は両群とも Pre に対して有意差はなかった。Cont 群と PS 群の Post 間の比較は、上述の CO 以外に有意差は認められなかった。

血液生化学検査の一部は表 14 に示した。NT-proBNP 濃度の Pre 値は両群とも高値を示していたが、両群とも Pre に対して有意差はなかった。TCHO、TG 濃度および CPK 活性は両群とも Pre に対し有意差はなかった。BUN、CRE、AST、ALT、TBIL、ALP、IP、Na、K および Cl 値は、両群とも基準範囲内の変動で Pre と比べ有意差はなかった。PS 群の ANP 濃度は Pre(124.9±114.8 pg/ml)で著しく高値を示したが、Post(73.1±44.5 pg/ml)との有意差は認められなかった。PS 群の HDLC 濃度は、Pre(219.6±63.9 mg/dl)と Post(178.8±28.3 mg/dl)間の有意差はなかった。LDLC 濃度も Pre(27.3±13.3 mg/dl)と Post(14.3±12.7 mg/dl)間で有意差はなかった。

表 12. 試験を実施した僧帽弁閉鎖不全症犬の概要

|              | Control 群 (n=7)              | PS 群 (n=5)                   |
|--------------|------------------------------|------------------------------|
| 犬種(頭)        | 雑種 :5<br>マルチーズ :1<br>シーズー :1 | 雑種 :3<br>マルチーズ :1<br>シーズー :1 |
| 年齢(歳)        | 11.3±1.4                     | 11.6±1.5                     |
| 性別(オス/メス)    | 4/3                          | 3/2                          |
| 体重(kg)       | 6.8±3.3                      | 9.0±4.2                      |
| ISACHC 心機能分類 | II                           | II                           |
| ACVIM ステージ分類 | C                            | C                            |
| PH/TR 併発(頭)  | 4/5                          | 3/4                          |
| 併用薬(頭)       |                              |                              |
| ACE 阻害薬      |                              |                              |
| アラセプリル       | 4                            | 2                            |
| エナラプリル       | 2                            | 2                            |
| ベナゼプリル       | 1                            | 1                            |
| ピモベンダン       | 7                            | 5                            |
| オメガ3 脂肪酸     | 1                            | 2                            |

平均±標準偏差 PS: プラバスタチン PH: 肺高血圧症 TR: 三尖弁閉鎖不全症

表 13. 各種循環パラメータの測定値

|              | Control 群  |             | PS 群       |              |
|--------------|------------|-------------|------------|--------------|
|              | Pre        | Post        | Pre        | Post         |
| MBP(mmHg)    | 98.6±7.3   | 99.0±7.9    | 96.6±12.3  | 100.8±10.0   |
| HR(bpm)      | 140.4±11.6 | 137.4±10.6  | 138.4±20.3 | 126.8±7.9    |
| LA/Ao        | 1.98±0.31  | 1.93±0.35   | 1.93±0.40  | 1.77±0.20    |
| FS(%)        | 41.2±4.9   | 47.5±7.6**  | 43.9±3.6   | 48.9±6.0*    |
| EF(%)        | 79.3±5.1   | 83.7±7.2**  | 82.2±3.4   | 86.2±4.9**   |
| LVIDd(mm)    | 24.2±5.5   | 24.6±5.0    | 31.2±8.3   | 29.7±7.3*    |
| LVIDs(mm)    | 14.2±3.2   | 12.9±3.1*   | 17.6±5.2   | 15.3±4.6*    |
| E 波(cm/s)    | 71.7±24.9  | 66.7±20.3   | 86.5±19.8  | 77.6±16.4    |
| A 波(cm/s)    | 74.5±19.2  | 70.8±16.3   | 66.6±26.1  | 65.4±23.8    |
| E/A          | 0.98±0.33  | 0.96±0.28   | 1.59±1.12  | 1.40±0.81    |
| DecT(ms)     | 85.7±13.7  | 93.4±18.9   | 91.2±34.0  | 112.8±23.8*  |
| CO(L/min)    | 0.49±0.15  | 0.55±0.13*  | 0.95±0.62  | 1.10±0.61*†  |
| SV(mL)       | 3.6±1.1    | 4.3±1.3*    | 7.6±5.6    | 9.1±6.2*     |
| 左室 Tei index | 0.54±0.06  | 0.46±0.09** | 0.55±0.15  | 0.35±0.16*** |
| 右室 Tei index | 0.42±0.17  | 0.41±0.16   | 0.65±0.27  | 0.46±0.16    |
| MRmax(cm/s)  | 404±170    | 410±179     | 383±123    | 415±155      |
| TRmax(cm/s)  | 303±129    | 274±128     | 322±90     | 152±57*      |
| sPA(mmHg)    | 51.2±33.1  | 44.3±30.5   | 54.0±21.1  | 20.2±6.7*    |
| Em(cm/s)     | 6.6±1.1    | 7.2±1.6     | 6.4±0.5    | 7.4±0.4*     |
| Am(cm/s)     | 7.9±2.3    | 7.6±2.3     | 7.7±1.5    | 7.2±2.1      |
| Em/Am        | 0.90±0.28  | 0.98±0.19   | 0.85±0.14  | 1.09±0.34    |
| E/Em         | 10.9±3.8   | 9.4±3.2**   | 13.4±2.3   | 10.6±2.3**   |
| MVGs(s)      | 2.16±0.98  | 2.57±1.43   | 1.73±0.30  | 2.86±0.90    |
| MVGe(s)      | -2.61±1.59 | -2.12±1.31  | -1.75±0.68 | -3.22±0.70*  |
| MVGa(s)      | -1.74±1.17 | -1.43±0.83  | -0.89±1.05 | -2.30±0.46   |

平均±標準偏差 MBP: 平均血圧 HR: 心拍数 LA/Ao: 左心房大動脈径比 FS: 左室内径短縮率 EF: 左室駆出率 LVIDd: 拡張末期左室内径 LVIDs: 収縮末期左室内径 E 波: 拡張早期波 A 波: 心房収縮期波 E/A: E 波と A 波の比 DecT: E 波減速時間 CO: 心拍出量 SV: 1 回拍出量 MRmax: 僧帽弁最高逆流速度 TRmax: 三尖弁最高逆流速度 sPA: 収縮期肺動脈圧 Em: 拡張早期波(僧帽弁輪部運動速波形) Am: 心房収縮期波(僧帽弁輪部運動速波形) Em/Am: Em と Am の比 E/Em: E 波と Em の比 MVGs: 収縮中期心筋速度勾配 MVGe: 拡張早期心筋速度勾配 MVGa: 心房収縮期心筋速度勾配

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs Pre † $P < 0.05$  vs Control 群 Post



表 14. 血液生化学検査の測定値

|                   | Control 群  |            | PS 群       |            |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|
|                   | Pre        | Post       | Pre        | Post       |
| NT-proBNP(pmol/l) | 2437±1202  | 2217±1265  | 3188±2873  | 2106±2342  |
| TCHO(mg/dl)       | 193.7±29.8 | 194.4±25.8 | 247.4±83.5 | 200.8±51.5 |
| TG(mg/dl)         | 66.0±21.0  | 77.7±36.3  | 98.0±57.0  | 74.2±40.9  |
| CPK(IU/l)         | 83.0±25.5  | 81.9±13.8  | 61.0±7.6   | 65.8±19.0  |

平均±標準偏差 NT-proBNP: 脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント濃度  
TCHO: 総コレステロール濃度 TG: トリグリセライド濃度 CPK: クレアチンフォスフォキナーゼ活性

## 考察

本研究では両群とも FS、EF、CO および SV の有意な増加と LVIDs、左室 Tei index および E/Em の有意な低下が認められた。FS、EF、CO および SV の増加と LVIDs の減少は両群において左室収縮能の亢進を示唆する。E/Em は左房圧や左室充満圧を推定でき [78]、左房圧減少と同時に E/Em は低下することが報告されている [90]。加えて、左室収縮能と拡張能を総合的に評価する左室 Tei index の低下から、両群とも左房圧の低下と左心不全を改善したと判断できる。さらに、人医領域では左室 Tei index の低下は、等容拡張時間が短縮し左室拡張能が改善することも意味している [21]。つまり、E/Em と左室 Tei index の低下から両群とも左室拡張能が亢進することが示唆された。これらの作用機序は、一般的治療薬である ACE 阻害薬とピモベンダン (Pimo) の動静脈拡張作用による前負荷と後負荷の軽減および Pimo の強心作用により、左室心機能の改善がみられたと推察された。

一方、Cont 群と PS 群 Post 値の比較では PS 群の CO が有意な増加を示した。これは PS の NO 産生増加 [70] からの末梢動脈拡張作用 [81] による後負荷軽減に起因すると推察された。さらに、PS の Ang II 減少作用 [58] からの末梢動脈収縮抑制効果も後負荷を軽減した要因と思われた。MR では一般的に逆流量の増加に伴って CO が減少す

るため、非投与群と比較して有意な CO 増加は、PS 追加投与による改善効果を示したと考えられた。また、PS 群では Pre と比較して DecT の延長、Em および MVGe の有意な増加がみられ、LVIDd、TRmax および sPA は有意に減少した。これらに対して Cont 群では Pre と比べ有意差はなかった。Em は拡張能と相関関係にあり [76]、左室拡張能低下に伴って減少する。DecT も左室拡張能評価指標のひとつであり、MVGe は心筋組織の拡張期伸展を定量化した検査である [43]。これらパラメータの増加からも PS は左室拡張能亢進作用を示したといえる。この作用機序は、PS の eNOS 由来 NO [70] により心筋弛緩作用が発揮されたためと推察された [80]。LVIDd の増加は MR 犬の死亡予測因子であると報告されているが [50]、PS 群では上述のとおり有意に減少した。そして、人非虚血性心不全患者の報告では、スタチン群は LVIDd と LVIDs の減少および EF の増加がみられたが [91]、本研究の PS 群の結果もこれと一致した。

人医領域において、PH 患者では eNOS の発現低下 [92] と ET1 の発現亢進 [93] による肺動脈収縮が PH の病因のひとつであることが明らかにされている。従って、本研究では、PS による eNOS 活性化 [70] と ET1 発現の減少 [88] による肺血管収縮の抑制が、TRmax と sPA を減少させた可能性がある。また、Rho キナーゼは低分子 G 蛋白 Rho の標的のひとつで、PH や動脈攣縮に関与している [82]。

スタチン類はこの Rho キナーゼ抑制効果を有することから [82]、PS による Rho キナーゼ阻害作用も肺動脈を拡張し、sPA の減少に寄与したのかもしれない。

尚、本研究における PS の投与量と投与期間は、ビーグル犬と人の臨床研究 [73,74] および第 3 章で示した筆者の健康犬における基礎研究を参考に、決定した。

本研究から ISACHC II および ACVIM ステージ C の MR 犬に対して、通常療法に PS の追加投与は血圧低下や HR 増加を起こさず、左房圧の低下、左室収縮能の亢進、左室拡張能の亢進、CO の増加および sPA の減少を招来し、慢性心不全を改善させた。従って、MR 犬への PS の投与は心機能改善に有効であることが示された。本研究は筆者の知る限り、MR 犬への PS 追加投与が有効な治療法となることを示した最初の報告である。

## 結論

第 1 章においては、重症急性心不全犬に対するミルリノンとカルペリチドの低用量併用療法は、血圧と心拍出量 (CO) の低下を起こさず、心拍数 (HR)、左室拡張末期圧、三尖弁最高逆流速度 (TRmax) および収縮期肺動脈圧 (sPA) を有意に低下し、救命し得た。さらに、腎保護の観点からも利尿薬は必要最小限にとどめることができたため、腎不全の悪化も生じることはなかった。本併用療法は、犬の慢性心不全の急性増悪期に対して有効な治療法となることを明らかにした。

第 2 章では、肺高血圧症 (PH) を呈した慢性心不全犬に対する低用量イマチニブ療法は、臨床症状スコア、HR、左心房径大動脈径比 (LA/Ao)、TRmax、sPA、右室と左室の Tei index、左室拡張早期流入速波形 (E 波) 僧帽弁輪運動速度 Em の比 (E/Em) および心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度を治療前に比べ治療後に有意に低下した。拡張期血圧 (DBP)、左室内径短縮率 (FS)、左室駆出率 (EF)、1 回拍出量 (SV)、CO は治療後有意に増加し、心不全の改善を認めた。低用量イマチニブ療法は、PH をもつ慢性心不全犬の治療薬として有効であることを明らかにした。

第 3 章では、健康犬におけるプラバスタチン (PS) の各種循環パラメータと血液生化学的性状に及ぼす影響を基

礎的に検討した。PS 投与は、LA/Ao、FS、EF、E 波、E/Em、収縮中期心筋速度勾配、SV、CO および左室と右室の Tei index を有意に減少し、Em と拡張早期心筋速度勾配 (MVGe) を有意に上昇した。これらの結果から、PS 投与は左室拡張能亢進、左室収縮力低下および左房圧低下作用を示すことを明らかにし、左室拡張不全や左房圧上昇した心不全犬に効果的であることを示唆した。

第 4 章では、ISACHC II および ACVIM ステージ C を呈した治療中の MR 犬に対して、PS 追加投与を行った。その結果、PS 投与群では非投与(対照)群に比べ CO の有意な増加が認められた。さらに、PS 投与群では PS 投与前に比べ収縮末期左室内径、拡張末期左室内径、左室 Tei index、TRmax、sPA および E/Em が有意に低下し、FS、EF、SV、CO、E 波減速時間、Em および MVGe が有意に上昇し、心不全の改善が認められた。これらの結果から、PS の投与は MR 犬の左房圧の低下、左室収縮能の亢進、左室拡張能の亢進、CO の増加および sPA の減少を招来し、PS は MR による慢性心不全の治療薬として有効であることを明らかにした。

以上のように、本研究は急性心不全に対するミルリノンとカルペリチドの低用量併用療法による治療効果ならびに慢性心不全に対するイマチニブおよびプラバスタチンの治療効果を初めて明らかにした。獣医臨床において、

本治療薬の使用は治療抵抗性の心不全犬における有効な  
選択肢と成り得ることが期待できる。

## 要約

第 1 章では、肺水腫を伴う左心不全または PH による右心不全を呈した重症急性心不全犬に対する新規治療として、ミルリノン (Mil) とカルペリチド (Car) の低用量併用療法の有効性を検討した。Mil と Car 投与直前値を Pre、Mil と Car 投与終了時を Post とし、治療前後には一般身体検査、一般血液検査、血液生化学検査、レントゲン検査、心拍数 (HR) と血圧測定および心エコー検査を実施した。心エコー検査ではパルスドプラー、連続波ドプラーおよび組織ドプラーを用いた各種循環パラメータの測定を行った。その結果、Mil と Car の低用量併用療法は血圧と心拍出量 (CO) の低下を起さず、腎不全の悪化を生じることなく、HR、左室拡張末期圧、三尖弁最高逆流速度 (TRmax) および収縮期肺動脈圧 (sPA) を有意に低下し、救命し得た。本併用療法は、犬の慢性心不全の急性増悪期に対して有効な治療法となることを明らかにした。

第 2 章では、MR または慢性フィラリア症により PH を呈し、既に治療を実施中の慢性心不全犬に対して、低用量のイマチニブ (既報告の抗腫瘍薬としての用量の約 1/3 量) を追加連続投与することにより、その有効性を検討した。第 1 章と同様の項目を測定し、イマチニブの投与前



と投与の30日後に評価した。その結果、臨床症状スコア、HR、左心房径大動脈径比(LA/Ao)、TRmax、sPA、右室と左室のTei index、左室拡張早期流入速波形(E波)と僧帽弁輪運動速度Emの比(E/Em)および心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度は、治療前に比べ治療後に有意な低下を示した。拡張期血圧(DBP)、左室内径短縮率(FS)、左室駆出率(EF)、1回拍出量(SV)、COは治療後有意に増加し、心不全の改善が認められた。従って、低用量イマチニブ療法は、PHをもつ慢性心不全犬の治療薬として有効であることを明らかにした。

第3章では、PSの各種循環パラメータと血液生化学的性状に及ぼす影響を健康犬において基礎的に検討した。実験群は、PS非投与の対照群ならびにPS 0.5、1および2 mg/kgを24時間毎に4週間、経口投与を行ったPS 0.5、PS 1およびPS 2群の計4群を設けた。検査項目の測定は第1章と同様の項目をPS投与前、PS投与1、2、4週間後に実施した。その結果、LA/Ao、FS、EF、E波、E/Em、収縮中期心筋速度勾配、SV、COおよび左室と右室のTei indexは有意に減少し、Emと拡張早期心筋速度勾配(MVGe)は有意に上昇した。これらの結果から、PS投与は左室拡張能亢進、左室収縮力低下および左房圧低下作用を示すことを明らかにし、左室拡張不全や左房圧上昇した心不全犬に効果的であることを示唆した。

第 4 章では、ISACHC II および ACVIM ステージ C を呈し、治療中の MR 犬における PS 投与の治療効果について検討した。治療中の MR 犬を PS 投与群と非投与（対照）群に分け、第 1 章と同様の検査項目を PS 投薬前と投薬 4 週間後に測定した。その結果、対照群と比較して PS 投与群では CO の有意な増加が認められた。さらに、PS 投与群では PS 投与前に比べ収縮末期左室内径、拡張末期左室内径、左室 Tei index、TRmax、sPA および E/Em が有意に低下し、FS、EF、SV、CO、E 波減速時間、Em および MVGe が有意に上昇した。これらの結果から、PS の投与は MR 犬の左房圧の低下、左室収縮能の亢進、左室拡張能の亢進、CO の増加および sPA の減少を招来し、PS は MR による慢性心不全の治療薬として有効であることを明らかにした。

以上のように、本研究は急性心不全に対するミルリノンとカルペリチドの低用量併用療法による治療効果ならびに慢性心不全に対するイマチニブおよびプラバスタチンの治療効果を初めて明らかにした。獣医臨床において、本治療薬の使用は治療抵抗性の心不全犬における有効な選択肢と成り得ることが期待できる。

## 謝 辞

本研究を遂行し、博士論文をまとめるにあたり、終始懇切なご指導とご高閲を賜りました、主指導教官の鳥取大学農学部獣医内科学日笠喜朗教授に心から感謝の意を表します。

また、副指導とご助言を賜りました山口大学農学部水野拓也教授および鳥取大学農学部竹内崇教授に深く感謝いたします。加えて、貴重なご助言をいただきました鳥取大学農学部岡本芳晴教授および大崎智弘准教授に深謝いたします。さらに、実験を進めるにあたり、御協力をいただきました有田総合動物病院の有田昇院長およびスタッフの皆様には深謝いたします。

最後に、いつも応援してくれた私の家族に感謝いたします。

## 引用文献

1. Jerie, P. 2007. Milestones of cardiovascular therapy V  
Diuretics. *Cas. Lek. Cesk.* 146: 858-862.
2. Rouby, J. J., Gory, G., Bourrelli, B., Glasser, P. and Viars, P.  
1982. Resistance to sodium nitroprusside in hypertensive  
patients. *Crit. Care. Med.* 10: 301-304.
3. Schrier, RW. 2006. Roll of diminished renal function in  
cardiovascular mortality: marker or pathogenetic factor. *J. Am.  
Coll. Cardiol.* 47: 1-8.
4. Uehara, E., Uesugi, T., Tasaka, T., Matsushashi, Y.,  
Tamura, T., Kuwajima, M. and Nagai, M. 2002.  
Reversible cardiomyopathy secondary to  
interferon-alpha in chronic myelogenous Leukemia. *Gan  
To Kagaku Ryouho* 29: 317-321.
5. Chetboul, V., Serres, F., Tissier, R., Lefebvre, H. P.,  
Sampedrano, C.C., Gouni, V., Poujol, L., Hawa, G. and  
Pouchelon, J.L. 2009. 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.* 23: 984-994.
6. Steele, J. L. and Henik, R.A. 2004. Pulmonary  
Hypertention. In: King. LG, ed. Textbook of

Respiratory Disease in Dogs and Cats. ST.Louis:  
Saunders, 498–504.

7. Johnson, L., Boon, J. and Orton, E.C.1999. Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992–1996. *J. Vet. Intern. Med.* 13: 440–447.
8. Bach, J. F., Rozanski, E. A., MacGregor, J., Betkowski, J. M. and Rush, J. E. 2006. Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 1132–1135.
9. Brown, A. J., Davison, E. and Sleeper, M. M. 2010. Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 850–854.
10. Atkinson, K. J., Fine, D. M., Thombs, L. A., Gorelick, J. J. and Durham, H. E. 2009. 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.* 23: 1190-1196.
11. Ghofrani, H. A., Seeger, W. and Grimminger, F. 2005. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *New Engl. J. Med.* 353: 1412-1413.

12. Vaughan, C. J., Murphy, M. B. and Buckley, B. M. 1996. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348: 1079-1082.
13. Ramasubbu, K., Estep, J., White, D. L., Deswal, A. and Mann, D. L. 2008. Experimental and clinical basis for the use of statins in patients with ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51: 415-426.
14. Monrad, E. S., Baim, D. S., Smith, H. S. and Lanoue, A. S. 1986. Milrinone, dobutamine, and nitroprusside: comparative effects on hemodynamics and myocardial energetics in patients with severe congestive heart failure. *Circulation* 73: 168-174.
15. 石川 淳 , 佐藤 修一 , 百瀬 和浩 , 浅野 雅晴 . 1993 . 麻醉イヌにおける Milrinone の血管拡張作用 . 薬理と臨床 3: 2247-2255 .
16. Wang, H., Gong, M., Zhou, B. and Dai, A. 2009. Comparison of inhaled and intravenous milrinone in patients with pulmonary hypertension undergoing mitral valve surgery. *Adv. Ther.* 26: 462-468.
17. Aisaka, K., Miyazaki, T., Hidaka, T., Ohno, T., Ishihara, T. and Kanai, T. 1992. Effects of nitric oxide-related compounds and carperitide on

- hemodynamics and hematocrit in anesthetized rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 59: 489-492.
18. Hidaka, T., Aisaka, K., Ohno, T. and Ishihara, T. 1993. Effects of carperitide (alpha-human atrial natriuretic peptide) on acute congestive heart failure in dogs. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 101: 233-151.
19. Barrett, C. J. and Schultz, H. D. 1999. Sympathoinhibitory effects of atrial natriuretic peptide in rats with heart failure. *J. Card. Fail.* 5: 316-323.
20. Sahn, D. J., DeMaria, A., Kisslo, J. and Weyman, A. 1978. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58: 1072-1083.
21. Tei, C. 1995. New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function. *J. Cardiol.* 26: 135-136.
22. Zoghbi, W. A., Enriquez-Sarano, M., Foster, E., Grayburn, P. A., Kraft, C. D., Levine, R. A., Nihoyannopoulos, P., Otto, C. M., Quinones, M. A., Rakowski, H., Stewart, W. J., Waggoner, A. and Weissman, N. J. 2003. American Society of Echocardiography. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with

- two-dimensional and Doppler echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 16: 777-802.
23. 川合基司. 2008. 静注用フローラン市販後調査結果. *Prog. Med.* 28: 486-492.
24. Kitagawa, H., Sasaki, Y., Ishihara, K. and Kawakami, M. 1991. Cardiopulmonary function values before and after heartworm removal in dogs with caval syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 52: 126-132.
25. Strickland, K. N. 1998. Canine and feline caval syndrome. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 13: 88-95.
26. Nicolle, A. P., Chetboul, V., Allerheiligen, T., Pouchelon, J. L., Gouni, V., Tessier-Vetzel, D., Sampedrano, C. C. and Lefebvre, H. P. 2007. Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *J. Vet. Intern. Med.* 21: 943-949.
27. Cooper, R., Ghali, J., Simmons, B. E. and Castaner, A. 1991. Elevated pulmonary artery pressure. An independent predictor of mortality. *Chest* 99: 112-120.
28. Humbert, M., Sitbon, O. and Simonneau, G. 2004. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *New Engl. J. Med.* 351: 1425-1436.
29. Ghofrani, H. A., Morrell, N. W., Hoeper, M. M., Olschewski, H., Peacock, A. J., Barst, R. J., Shapiro, S., Golpon, H., Toshner, M., Grimminger, F. and Pascoe, S.



2010. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 182: 1171–1177.
30. Pietra, G. G., Edwards, W. D., Kay, J. M., Rich, S., Kernis, J., Schloo, B., Ayres, S. M., Bergofsky, E. H., Brundage, B. H. and Datre, K. M. 1989. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 80: 1198-1206.
31. Mandegar, M., Fung, Y. C., Huang, W., Remillard, C. V., Rubin, L. J. and Yuan, J. X. 2004. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc. Res.* 68: 75-103.
32. Barst, R. J. 2005. PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 115: 2691-2694.
33. Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P., Durand-Gasselín, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., Herve, P., Emilie, D., Eddahibi, S., Simonneau, G., Souza, R. and Lambert, M. 2008. Platelet-derived

- growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 178: 81-88.
34. Ogawa, A., Nakamura, K., Matsubara, H., Fujio, H., Ikeda, T., Kobayashi, K., Miyazaki, I., Asanuma, M., Miyaji, K., Miura, D., Kusano, K. F., Date, H. and Ohe, T. 2005. Prednisolone inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 112: 1806-1812.
35. Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J. and Lydon, N. B. 2000. Abl protein-tyrosine kinase inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 139-45.
36. Isotani, M., Ishida, N., Tominaga, M., Tamura, K., Yagihara, H., Ochi, S., Kato, R., Kobayashi, T., Fujita, M., Fujino, Y., Setoguchi, A., Ono, K., Washizu, T. and Bonkobara, M. 2008. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 985-988.
37. London, C. A. 2009. Tyrosin kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top. Companion. Anim. Med.* 24:

106-112.

38. Rabinovitch, M. 2008. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 118: 2372- 2379.
39. Schermuly, R. T., Dony, E., Ghofrani, H. A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y. J., Weissmann, N., Seeger, W. and Grimminger, F. 2005. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115: 2811-2821.
40. Abe, K., Toba, M., Alzoubi, A., Koubsky, K., Ito, M., Ota, H., Gairhe, S., Gerthoffer, W. T., Fagan, K. A., McMurtry, I. F. and Oka, M. 2011. Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 45: 804-808.
41. Hori, Y., Yamano, S., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N. and Higuchi, S. 2011. Clinical implications of measurement of plasma atrial natriuretic peptide concentration in dogs with spontaneous heart disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239: 1077-1083.
42. Lewis, J. F., Kuo, L. C., Nelson, J.G., Limacher, M. C. and Quinones, M. A. 1984. Pulsed Doppler echocardiographic determination of stroke volume and cardiac output: clinical validation of two new methods using the apical window. *Circulation* 70: 425-431.

43. Uematsu, M., Miyatake, K., Tanaka, N., Matsuda, H., Sano, A., Yamazaki, N., Hiramata, M. and Yamagishi, M. 1995. Myocardial velocity gradient as a new indicator of regional left ventricular contraction: detection by a two-dimensional tissue Doppler imaging technique. *J. Am. Coll. Cardiol.* 26: 217-223.
44. Hatano, M., Yao, A., Shiga, T., Kinugawa, K., Hirata, Y. and Nagai, R. 2010. Imatinib mesylate has the potential to exert its efficacy by down-regulating the plasma concentration of platelet-derived growth factor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Int. Heart. J.* 51: 272-276.
45. Vuorinen, K., Gao, F., Oury, T. D., Kinnula, V. L. and Myllarniemi, M. 2007. Imatinib mesylate inhibits fibrogenesis in asbestos-induced interstitial pneumonia. *Exp. Lung. Res.* 33: 357-373.
46. Souza, R., Sitbon, O., Parent, F, Simonneau, G. and Humbert, M. 2006. Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 61: 736.
47. Chaudhary, N. I., Schnapp, A. and Park, J. E. 2006. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 173: 769-776.
48. Gouni, V., Serres, F. J., Pouchelon, J. L., Tissier, R.,

- Lefebvre, H. P., Nicolle, A. P., Sampedrano, C. C. and Chetboul, V. 2007. Quantification of mitral valve regurgitation in dogs with degenerative mitral valve disease by use of the proximal isovelocity surface area method. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231: 399-406.
49. Klein, M., Schermuly, R. T., Ellinghaus, P., Milting, H., Riedl, B., Nikolova, S., Pullamsetti, S. S., Weissmann, N., Dony, E., Savai, R., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Busch, A. E. and Schafer, S. 2008. Combined tyrosine and serine/tyreonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation.* 118: 2081-2090.
50. Moonarmart, W., Boswood, A., Luis, Fuentes. V., Brodbelt, D., Souttar, K. and Elliott, J. 2010. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *J. Small. Anim. Pract.* 51: 84-96.
51. Borgarelli, M., Savarino, P., Crosara, S., Santilli, R. A., Chiavegato, D., Poggi, M., Bellino, C., La Rosa, G., Zanatta, R., Haggstrom, J. and Tarducci, A. 2008. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to

- myxomatous valve disease. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 120-128.
52. Greco, D. S., Biller, B. and Van Liew, C. H. 2003. Measurement of plasma atrial natriuretic peptide as an indicator of prognosis in dogs with cardiac disease. *Can. Vet. J.* 44: 293-297.
53. Serres, F., Pouchelon, J. L., Poujol, L., Lefebvre, H. P., Trumel, C., Daste, T., Sampedrano, C. C., Gouni, V., Tissier, R., Hawa, G. and Chetboul, V. 2009. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J. Vet. Cardiol.* 11: 103-121.
54. Kaye, D. M., Lambert, G. W., Lefkovits, J., Morris, M., Jennings, G. and Esler, M. D. 1994. Neurochemical evidence of cardiac sympathetic activation and increased central nervous system norepinephrine turnover in severe congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23: 570-578.
55. Nakamura, H., Arakawa, K., Itakura, H., Kitabatake, A., Goto, Y., Toyota, T., Nakaya, N., Nishimoto, S., Muranaka, M., Yamamoto, A., Mizuno, K. and Ohashi, Y. 2006. Primary prevention of cardiovascular disease with

- pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomized controlled trial. *Lancet* 368: 1155-1163.
56. Shepherd, J., Cobbe, S. M., Ford, I., Isles, C. G., Lorimer, A. R., MacFarlane, P. W., Mckillop, J. H. and Packard, C. J. 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *New Engl. J. Med.* 333: 1301-1307.
57. Zhao, H., Liao, Y., Minamino, T., Asano, Y., Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Takashima, S., Hori, M. and Kitakaze, M. 2008. Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. *Hypertens. Res.* 31: 1977-1987.
58. Herring, N., Lee, C.W., Sunderland, N., Wright, K. and Paterson, D. J. 2011. Pravastatin normalises peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50: 99-106.
59. Nickenig, G., Baumer, A.T., Temur, Y., Kebben, D., Jockenhovel, F. and Bohm, M. 1999. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation* 100: 2131-2134.

60. Albert, M.A., Danielson, E., Rifai, N. and Ridker, P. M. 2001. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *J.A.M.A.* 286: 64-70.
61. Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M.A., Sacks, F. and Braunwald, E. 1999. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 100: 230-235.
62. Adam, O., Frost, G., Custodis, F., Sussman, M.A., Schafers, H. J., Bohm, M. and Laufs, U. 2007. Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50: 359-367.
63. Issac, T. T., Dokainish, H. and Lakkis, N. M. 2007. Role of inflammation in initiation and perpetuation of atrial fibrillation: a systematic review of the published data. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50: 2021-2028.
64. Komatsu, T., Tachibana, H., Sato, Y., Ozawa, M., Kunugida, F., Orii, M. and Nakamura, M. 2009. Long-term efficacy of upstream therapy using angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins in combination with antiarrhythmic agents for the treatment of paroxysmal atrial fibrillation. *Int. Heart.*



- J.* 50: 465-476.
65. Li, L., Yao, Y., Wang, H., Ren, Y., Ma, L., Yan, J. and Gao, C. 2010. Pravastatin attenuates cardiac dysfunction induced by lysophosphatidylcholine in isolated rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.* 640: 139-142.
66. Thuc, L. C., Teshima, Y., Takahashi, N., Nishio, S., Fukui, A., Kume, O., Ezaki, K., Miyazaki, H., Yufu, K., Hara, M., Nakagawa, M. and Saikawa, T. 2011. Cardioprotective effects of pravastatin against lethal ventricular arrhythmias induced by reperfusion in the rat heart. *Circ. J.* 75: 1601-1608.
67. Casani, L., Sanchez-Gomez, S., Vilahur, G. and Badimon, L. 2005. Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering. *Thromb. Haemost.* 94: 1035-1041.
68. Datar, R., Keasemeyer, W.H., Chandra, S., Fulton, D. J. and Caldwell, R. W. 2010. Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B1,G protein subunit Gi, phospholipase C and calcium influx. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1765-1772.
69. Martinez-Gonzalez, J. and Badimon, L. 2007. Influence of statin use on endothelial function: from bench to clinics. *Curr. Pharm. Des.* 13: 1771-1786.
70. Rikitake, Y. and Liao, J. K. 2005. Rho GTPases,

- statins, and nitric oxide. *Circ. Res.* 97: 1232-1235.
71. Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rutten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H. and Zeiher, A. M. 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 108: 391-397.
72. Braunwald, E. and Kloner, R. A. 1982. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66: 1146-1149.
73. Ichihara, K., Satou, K. and Abiko, Y. 1993. Influences of pravastatin and simvastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, on myocardial stunning in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22: 852-856.
74. Landmesser, U., Bahlmann, F., Mueller, M., Spiekermann, S., Kirchhoff, N., Schulz, S., Manes, C., Fischer, D., de Groot, K., Fliser, D., Fauler, G., Marz, W. and Drexler, H. 2005. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 111: 2356-2363.
75. Oki, T., Tabata, T., Yamada, H., Wakatsuki, T., Shinohara, H., Nishikado, A., Iuchi, A., Fukuda, N. and Ito, S. 1997. Clinical application of pulsed Doppler tissue imaging for assessing abnormal left ventricular

- relaxation. *Am. J. Cardiol.* 79: 921-928.
76. Hori, Y., Kunihiro, S., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N. and Higuchi, S. 2009. The relationship between invasive hemodynamic measurements and tissue Doppler-derived myocardial velocity and acceleration during isovolumic relaxation in healthy dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1419-1425.
77. Ommen, S. R., Nishimura, R. A., Appleton, C. P., Miller, F. A., Oh, J. K., Redfield, M. M. and Tajik, A. J. 2000. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation* 102: 1788-1794.
78. Schober, K. E., Bonagura, J. D., Scansen, B. A., Stern, J. A. and Ponzio, N. M. 2008. Estimation of left ventricular filling pressure by use of Doppler echocardiography in healthy anesthetized dogs subjected to acute volume loading. *Am. J. Vet. Res.* 69: 1034-49.
79. Xu, Z., Okamoto, H., Akino, M., Onozuka, H., Matsui, Y. and Tsutsui, H. 2008. Pravastatin attenuates left ventricular remodeling and diastolic dysfunction in angiotensin II -induced hypertensive mice. *J.*

- Cardiovasc. Pharmacol.* 51: 62-70.
80. Brunner, F., Maier, R., Andrew, P., Wolkart, G., Zechner, R. and Mayer, B. 2003. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res.* 57: 55-62.
81. Sase, K. and Michel, T. 1997. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends. Cardiovasc. Med.* 7: 28-37.
82. Shimokawa, H. and Takeshita, A. 2005. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1767-1775.
83. Napp, A., Brixius, K., Pott, C., Ziskoven, C., Boelck, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R. H. and Block, W. 2009. Effects of the beta3-adrenergic agonist BRL 37344 on endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and force of contraction in human failing myocardium. *J. Card. Fail.* 15: 57-67.
84. Henik, R.A. 1997. Systemic hypertension and its management. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 27: 1355-1377.
85. Manning, P. J. 1979. Thyroid gland and arterial lesions of Beagles with familial hypothyroidism and

- hyperlipoproteinemia. *Am. J. Vet. Res.* 40: 820-828.
86. Fine, D. M., DeClue, A. E. and Reiner, C. R. 2008. 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.* 232: 1674-1679.
87. Schindler, C., Thorns, M., Matschke, K., Tugtekin, S. M. and Kirch, W. 2007. Asymptomatic statin-induced rhabdomyolysis after long-term therapy with the hydrophilic drug pravastatin. *Clin. Ther.* 29: 172-176.
88. Verma, S., Rao, V., Weisel, R. D., Li, S. H., Fedak, P. W., Miriuka, S. and Li, R. K. 2004. Novel cardioprotective effects of pravastatin in human ventricular cardiomyocytes subjected to hypoxia and reoxygenation: beneficial effects of statins independent of endothelial cells. *J. Surg. Res.* 119: 66-71.
89. Kobashigawa, J. A., Katznelson, S., Laks, H., Johnson, J. A., Yeatman, L., Wang, X. M., Chia, D., Terasaki, P. I., Sabad, A. and Cogert, G. A. 1995. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *New Engl. J. Med.* 333: 621-627.
90. Suzuki, S., Ishikawa, T., Hamabe, L., Aytemiz, D., Huai-Che, H., Fukushima, R., Machida, N. and Tanaka, R.

2011. The effect of furosemide on left atrial pressure in dogs with mitral valve regurgitation. *J. Vet. Intern. Med.* 25: 244-250.
91. Sola, S., Mir, M. Q., Lerakis, S., Tandon, N. and Khan, B. V. 2006. Atorvastatin improves left ventricular systolic function and serum markers of inflammation in nonischemic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47: 332-337.
92. Giaid, A. and Saleh, D. 1995. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New Engl. J. Med.* 333: 214-221.
93. Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P. and Stewart, D. J. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New Engl. J. Med.* 328: 1732-1739.