

氏名(本籍)	藤井洋子(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第400号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	犬の軽度慢性僧帽弁閉鎖不全症における神経体液性因子の変化
論文審査委員	(主査) 若尾義人 (副査) 赤堀文昭 山田隆紹 田中智夫

論文内容の要旨

背景および目的

犬の僧帽弁閉鎖不全症 (Mitral Insufficiency、僧帽弁逆流症: Mitral Regurgitation: MR) に対する治療指針としては、これまで多くの検討がなされてきた。中程度から重度のMR慢性病期に対して、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, ACEi) は、獣医領域では唯一その延命効果が証明されている薬剤であり、本症の第1選択薬として認識されている。一方、軽度で心不全兆候が認められないMRに対する治療方針は未だ不明である。現在まで臨床的研究がいくつか報告されているが、初期投薬の有効性を肯定する証拠は得られていない。しかし、一方で、同様に無徴候期の軽度な病期における血中レニン活性や循環中カテコラミンの上昇が報告され、そのような変化に対する早期治療の可能性も示唆されており、統一された見解は現在のところ提唱されていない。

現在、心疾患によって変化を受けた神経体液性因子の是正が、心疾患治療の主流となっている。初期で軽度のMR治療の必要性を検討するためにはその病期における神経体液性因子の変化をより正確に捉える必要があると考え、今回著者は特に自律神経機能およびレニン—アンジオテンシン—アルドステロン (Renin-Angiotensin-Aldosterone: RAA) 系に注目した。本研究の目的は、犬のMR、特に世界小動物心臓病会議 (International Small Animal Cardiac Health Council: ISACHC) クラスIという軽度な段階における自律神経機能およびRAA系などの神経体液性因子の変化を検討することである。本研究の成果により、犬の心疾患のうち最も多くのpopulationを有する無徴候期のMRの治療指針に多大な影響を与えることが期待される。

第1実験：軽度MRモデル犬における心拍変動解析による自律神経機能の評価

心拍変動解析法は、非侵襲的および長時間にわたって自律神経機能を評価し、定量化できる方法と

して広く臨床応用されている。第1実験の目的は、実験的に作成したMRモデル犬における自律神経機能を評価することである。**材料と方法**：臨床上異常の見られないビーグル犬5頭を用い、実験的にMRを作成し、その前後における心拍変動解析を行った。MRモデル犬の心不全ステージは、ISACHCクラスIと、無徴候で軽度な段階のMRであった。心拍変動解析には、一定環境下で24時間記録されたホルター心電図を用い、周波数解析により低周波成分 (Low Frequency : LF) および高周波成分 (High Frequency : HF) を算出した。また、LF/HFおよび心拍数も算出した。1日24時間を0時から6時、6時から12時、12時から18時、18時から0時の4時間帯に分割し、各測定値についてそれぞれの時間帯における平均値および標準誤差を算出した。**成績**：心拍数およびLFは、1日を通じてMR作成前 (Control) およびMR作成後に両者の間に有意差は認められなかったが、HFは6時から12時の時間帯においてMR作成後に有意な低下が認められた。LF/HFは、0時から18時、6時から12時、12時から18時の時間帯では、Controlと比較しMR作成後に有意な増大が認められた。**小括**：本研究で作成したMRモデル犬は、無徴候で心拡大も重度ではない、軽度な段階のMRであるにもかかわらず、迷走神経活性の指標であるHFが有意に低下し、交感神経系の簡易的な指標であるLF/HFの有意な上昇が認められた。したがって、この段階のMRであってもすでに自律神経機能に変化を来していることが確認された。

第2実験：軽度MRモデル犬におけるアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi) の自律神経機能に及ぼす影響

心疾患における自律神経機能の変化を担う主な機序としてRAA系が挙げられることから、第1実験で認められた変化がRAA系に起因するか否か検討することを目的に、第2実験では、同MRモデル犬にACEiを投与し、その自律神経機能に及ぼす影響を観察した。**材料と方法**：第1実験と同様のMRモデル犬5頭を用い、塩酸ベナゼプリル (0.5mg/kg, SID) を2週間投与し、投与前および投与中に第1実験と同様に心拍変動解析を行った。**成績**：心拍数は、0時から6時、12時から18時の時間帯でACEi投与により有意な減少が認められた。HFは、0時から6時、6時から12時、18時から0時の時間帯において、ACEi投与により有意な増大が認められた。LFは、ACEi投与により1日を通じて有意な増大が認められた。LF/HF%は、ACEi投与による差は認められなかった。**小括**：MR作成後に低下していたHFが有意に増大し正常に復する傾向が認められたことから、RAA系は軽度MRにおける自律神経機能変化の原因の一端を担っていると考えられた。

第3実験：軽度MRモデル犬における循環中および心筋組織内アンジオテンシンII産生系に関する検討

第1実験の結果から、軽度なMRにおいても自律神経機能に変化を来していることが示唆された。この原因として様々な因子が関与していることが考えられたが、その中でもRAA系の影響は大きいと推察され、第2実験においてそれが立証された。そこでさらにRAA系の変化を詳細に捉える必要があると考え、第3実験では組織アンジオテンシンII産生系および循環中RAA系に注目し、さらに臨床例に近いと思われる慢性経過した軽度MRモデル犬のRAA系の変化について検討した。**材料と方法**：第1

実験と同様の方法でMRを作出し、2年以上3年以下の慢性経過を観察した結果、臨床徴候が認められないISACHCクラスI bのMEモデル犬5頭を使用した。また対照群として、臨床上健康なビーグル犬6頭にSham手術を実施し、術後安定した時点で実験に使用した。循環中RAA系の測定項目は、血漿レニン活性（PRA）、アンジオテンシンI濃度、アンジオテンシンII濃度、アルドステロン濃度とした。組織RAA系の測定には、左室後壁部を使用し、測定項目は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）活性およびキマーゼ活性とした。測定はHPLC法にて行った。成績：循環中RAA系の各測定項目について、両群の間に有意な差は認められなかった。一方、組織RAA系については、ACE活性はSham群と比較してMR群のACE活性の有意な上昇が認められ、キマーゼ活性はMR群で有意な低下が認められた。小括：正常と比較しMRモデル犬では、循環中RAA系に特異的な変化は認められなかったが、左室局所におけるACE活性は有意に増大し、一方左室キマーゼ活性は有意に低下した。したがって、軽度な慢性MRの結果、循環中のRAA系に変化は認められないにもかかわらず心筋内酵素活性に変化をもたらしていることが示唆され、MR初期段階では循環中RAA系よりもむしろ組織RAA系が強く関与していることが確認された。

総括

慢性心不全では、心不全が増悪するにしたがって自律神経機能に変化が認められる。心不全患者において心機能障害初期から副交感神経機能は急激に低下し、それに加えて心機能障害が高度になるにしたがって交感神経活性が亢進することが報告されている。本研究では軽度の不全心を標的とし、第1実験にて軽度の段階においてもすでに迷走神経活動の低下、交感神経活動の増加などの自律神経機能の変化が認められることが確認された。このような自律神経の変化は、血行動態に変化を来していない病期であることから、動脈圧受容体および心肺容量受容体の異常に起因すると推察された。

このような圧受容体機能に影響を及ぼす因子として、先ずRAA系が挙げられている。そこで第2実験では、自律神経機能に生じた変化がRAA系に起因するか否かを検証する目的で、同様の軽度MR犬にACEiを投与し自律神経系に及ぼす影響を検討した。その結果、低下していた迷走神経活性が増大したことから、RAA系が軽度な病期における自律神経機能変化の一端を担っていることが確認された。

第3実験ではさらにRAA系に注目し、軽度MRモデル犬においてすでに循環中および組織RAA系が活性化されているか否かを検討した。これまでの研究では、重篤な心疾患あるいは急性モデル動物における循環中RAA系に変化は認められているが、代償期では必ずしもそうではなく測定値にばらつきがあり、一定の傾向が認められていない。本研究においても、循環中RAA系のどのパラメーターもSham群と比較してMR群において統計学的に有意な差は認められなかった。一方、組織RAA系については、本研究においてMR群におけるACE活性の増加およびキマーゼ活性の低下が認められた。このことは、MR初期段階では循環中のRAA系よりもむしろ組織RAA系が強く関与していることが確認された。このように、MRの早期より神経体液性因子に変化が認められることから、初期治療は必ずしも否定されるべきではないことが示唆された。本研究により、神経体液性因子の観点から初期病態を

解明できたことは、初期病態に対する今後の治療方針を考慮する際、非常に有用な情報を提供したと考えられた。

結語

犬の軽度MRモデルを用いて神経体液性因子に及ぼす影響を検討した結果、以下の知見が得られた。

1. 心拡大が顕著に生じておらず無症候性の軽度なMR犬において自律神経の変化を捉える目的で、24時間心電図を記録し心拍変動スペクトル解析による検討を行った。その結果、MR群でHFが低下し、LF/HFが増大したことから、軽度な段階においても既に自律神経機能に変化を来していることが確認された。
2. 同MRモデル犬に対し、ACEiを投与したところHFが増大したことから、軽度なMRの病期における自律神経機能の変化にRAA系が関与していることが確認された。
3. 慢性経過した同MRモデル犬の循環中RAA系に変化は認められなかったが、左室局所における組織ACE活性は有意に増大し、キマーゼ活性は有意に低下していたことから、循環中RAA系に変化が認められなくても組織RAA系はすでに変化を来していることが解明された。
4. 神経体液性因子の観点から、初期病態を解明できたことは、初期MRに対する治療方針を考慮する際、極めて有用な情報を提供するものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

犬の僧帽弁閉鎖不全症 (= MI、あるいは僧帽弁逆流症 = MR) は、後天性心疾患として最も発生頻度の高い疾患であることから、その治療に関しては多くの報告がある。通常、心不全徴候が発現した場合に内科的治療が開始され、特に中程度から重度のMR慢性病期に対して、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi) は、本症の第1選択薬として用いられている。一方、心不全徴候が認められない軽度なMRに対する治療方針に関しては一定の見解は得られておらず、治療に際して不明な点が多い。

軽度MRに対する治療に関しては、現在まで臨床的研究がいくつか報告されているものの、無徴候期における初期治療の有効性を肯定する証拠は得られていない。しかしながら、一方では、無徴候期の軽度な病期における血中レニン活性および循環中カテコラミンの上昇が報告されており、早期治療の有効性も示唆されている。

現在、心疾患の治療では、心不全徴候に伴う神経体液性因子の是正が主流であるが、軽度のMRに対する神経体液性因子関与の有無、あるいはその関与と治療との関係に関しては、非常に重要な事項であるにもかかわらず、殆ど検討されていないのが現状である。

今回筆者は、軽度MR治療時における自律神経機能およびレニン—アンジオテンシン—アルドステロン (RAA) 系に注目し、世界小動物心臓病会議 (ISACHC) クラス I のMRに対する自律神経機能およびRAA系などの神経体液性因子の変化について検討を加えた。その結果、軽度MR時に自律神経機

能はすでに影響されており、さらにその影響がRAA系によって引き起こされていることを証明すると同時に、そのRAA系の変化は、循環血液中よりもむしろ組織内RAA系の影響を強く受けていることを解明した。その成績の概要は以下のごとくである。

第1実験：軽度MRモデル犬における心拍変動解析による自律神経機能の評価

筆者は第1実験として、実験的に作成した軽度MRモデル犬における自律神経機能の評価することを目的に、心拍変動解析法を用いて非侵襲的に長時間における自律神経機能の評価した。実験には、臨床異常の見られないビーグル犬5頭を用い、実験的にMRを作成し、作成前後における心拍変動解析を行った。作成したMRモデル犬の心不全ステージは、無症状で軽度なMR (ISACHCクラスI)であった。この軽度MR犬に対して一定環境下で24時間ホルター心電計を装着し、得られた心電図の周波数解析により、交感神経および迷走神経活性の両者の指標である低周波成分 (Low Frequency : LF) および迷走神経活性の指標として評価されている高周波成分 (High Frequency : HF)、さらに、交感神経活性を簡易的に表現しているとされているLF/HFおよび心拍数を算出した。また、1日24時間を0時から6時、6時から12時、12時から18時、18時から0時の4時間帯に分割し、各測定値についてそれぞれの時間帯における平均値および標準誤差を算出した。

その結果、心拍数およびLFは、MR作成前 (Control) およびMR作成後の両者間に有意差は認めなかったが、HFでは、6時から12時の時間帯においてMR作成後に有意な低下を認めた。また、LF/HFは、0時から18時、6時から12時、12時から18時の時間帯では、Controlと比較しMR作成後に有意な増大を認めた。

これらの成績から筆者は、軽度MRにおいても、迷走神経活性が低下し、また、交感神経系活性の上昇を認めたことから、すでにこの段階のMRにおいても自律神経機能に変化が来していることを確認した。

第2実験：軽度MRモデル犬におけるアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi) の自律神経機能に及ぼす影響

これまでの多くの報告から、心疾患における自律神経機能の変化を担う主な機序としてRAA系が挙げられることから筆者は、第1実験で認められた変化がRAA系に起因するか否か検討することを目的に、第2実験では、同MRモデル犬にACEiを投与し、その自律神経機能に及ぼす影響を観察した。

実験には第1実験と同様のMRモデル犬5頭を用い、塩酸ベナゼプリル (0.5mg/kg、SID) を2週間投与し、投与前および投与中に第1実験と同様に心拍変動解析を行った。

その結果、心拍数は、0時から6時、12時から18時の時間帯で、ACEi投与により有意な減少を認め、HFは、0時から6時、6時から12時、18時から0時の時間帯において、ACEi投与により有意に増大することを認めた。また、LFは、ACEi投与により全ての時間帯で有意な増大を認めた。さらに、LF/HFでは、ACEi投与による差は認めなかった。

以上の成績から筆者は、MR作成後に低下していたHFが、ACEi投与により有意に増大し、正常に復する傾向を認めたことから、軽度MRにおける自律神経機能変化の原因の一端をRAA系が担ってい

ることを確認した。

第3実験：軽度MRモデル犬における循環中および心筋組織内アンジオテンシンⅡ産生系に関する検討

これまでの第1および第2実験の結果から筆者は、軽度なMRにおいても自律神経機能に変化が生じていること、その原因としてRAA系の変化がその一端を担っていることを立証した。しかしながら、RAA系には循環中および組織RAA系の2系統があり、軽度MRではどちらの変化が主に作用しているかを詳細に捉える必要があると考え、第3実験では組織アンジオテンシンⅡ産生系および循環中RAA系に注目し、臨床例に近いと思われる慢性経過の軽度MRモデル犬のRAA系の変化について検討を加えた。

実験方法は、第1実験と同様の方法でMRを作出し、2年以上3年以下の慢性経過を観察後、症状が認められないISACHCクラスⅠのMRモデル犬5頭を使用した。また対照群として、临床上健康なビーグル犬6頭にSham手術を実施し、術後安定した時点で実験に使用した。循環中RAA系の測定項目は、HPLC法を用いて血漿レニン活性（PRA）、アンジオテンシンⅠ濃度、アンジオテンシンⅡ濃度、アルドステロン濃度とした。また、組織RAA系の測定には、左室後壁部を使用し、測定項目は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）活性およびキマーゼ活性とした。

その結果、循環中RAA系の各測定項目について、両群間に有意な差は認めなかったが、組織RAA系については、ACE活性はSham群と比較してMR群で有意な上昇を認め、キマーゼ活性はMR群において有意な低下を認めた。

これらの成績から筆者は、軽度MRモデル犬では、循環中のRAA系に変化は認められないにもかかわらず、心筋内酵素活性はすでに変化していたことを観察し、MR初期段階では循環中RAA系よりもむしろ組織RAA系が強く関与していることを確認した。

以上、第1～第3実験の成績から筆者は、犬の軽度MRモデルを用いて神経体液性因子に及ぼす影響を考察し、以下の知見を得た。

1. 心拡大が顕著に生じておらず無徴候性の軽度なMR犬において自律神経の変化を捉える目的で、24時間心電図を記録し心拍変動スペクトル解析による検討を行った結果、MR群でHFが低下し、LF/HFが増大したことから、軽度な段階においても既に自律神経機能に変化を来していることを確認した。
2. 軽度MRモデル犬に対し、ACEiを投与した結果、HFが増大したことから、軽度なMRの病期における自律神経機能の変化の一端にRAA系が関与していることを確認した。
3. 慢性経過した軽度MRモデル犬の循環中RAA系に変化は認めなかったが、左室局所における組織ACE活性は有意に増大し、キマーゼ活性は有意に低下したことから、循環中RAA系に変化が認められない時期に、組織RAA系にはすでに変化を来していることを明らかにした。

以上のごとく、本論文の成績によって神経体液性因子の観点から、軽度MRの病態を解明できたことは、初期MRに対する治療方針を考慮する際、極めて有用な情報を提供するものと考えられ、今後における獣医臨床分野への貢献は極めて大きく、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績であると判定した。