

犬の僧帽弁修復術のリスク因子とチワワにおける
僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子に関する研究

Study of risk factors of mitral valve repair in dogs and genes
associated with mitral valve degeneration in Chihuahuas

2020年2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

分子生物学

DV 1606 俣田 和也

略語

BCP; Blood crystalloid cardioplegia	血液カルディオプレジア
CCP; Crystalloid cardioplegia	晶質液カルディオプレジア
CI; Confidence interval	信頼区間
LA/Ao; Left atrium to aortic root ratio	左心房大動脈径比
LVIDDN; Standardized left ventricular end-diastolic diameter	体重標準化 左心室拡張末期径
MR; Mitral regurgitation	僧帽弁逆流
MVD; Mitral valve degeneration	僧帽弁変性
OR; Odds ratio	オッズ比
SERT; Serotonin Transporter	セロトニン受容体
UDP; Unilateral diaphragmatic paralysis	片側横隔神経麻痺
XPC; Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C	
VHS; Vertebral heart size	胸骨心臓サイズ

論文要旨

【緒言】

犬において、僧帽弁閉鎖不全症は後天性心疾患の中で最も発生率の高い疾患である。僧帽弁閉鎖不全症は小型犬で多く認められ、特定の犬種で発症率が高いことから、本疾患の発生に遺伝的な関与が考えられている。しかし、これまで僧帽弁閉鎖不全症の発生に関わる遺伝的なメカニズムは明らかにされておらず、根治治療は行われていないのが実際である。僧帽弁閉鎖不全症の治療は内科治療が一般的であるが、重症例の場合、うっ血性心不全を続発する。うっ血性心不全を発症した症例では、予後が制限されることが明らかになっている。近年、犬においても僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療が行われるようになり、予後の改善が可能となった。しかしながら、現在まで僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療のリスク因子や合併症に関する情報は少なく、これらの手術成績への影響は不明である。

本研究は犬の僧帽弁閉鎖不全症の臨床学的な側面として、外科治療の手術成績の向上を目的に、合併症のリスク因子と合併症の手術成績に与える影響について検討した。また遺伝学的な側面として、好発犬種の中でも日本で飼育頭数が多く、外科治療を受ける犬種の中で高い割合を占めるチワワに着目し、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の調査を行った。

【第1章】 僧帽弁修復術における大動脈遮断解除後に発生する心室細動に関する検討

[目的] 心室細動は電気的な心室の興奮は認められるものの、心臓のポンプ機能は失われた状態であり、すみやかに治療が奏功しない場合、致死性の不整脈である。本章では、手術成績の向上を目的に術中の致死的な合併症である大動脈遮断解除後に発生する心室細動を予測するリスク因子の調査を行った。

[方法] 2015年11月から2017年9月までに僧帽弁修復術を実施した犬237例を対象とした。心筋保護液は晶質液カルディオプレジア (CCP) または CCP と自己血液を1:1で混合した血液-晶質液カルディオプレジア (BCP) を使用した。心室細動の予測因子として年齢、体重、左心房・大動脈径比 (LA/Ao)、標準化左室拡張末期径 (LVIDDN)、大動脈遮断時間、心筋保護液の種類、カルディオプレジア投与量について検討を行った。また心筋保護液の違いによる影響の評価として、術中の輸血使用量、術後1ヵ月の時点での生存率と心臓サイズの縮小効果を比較した。

[結果] 心室細動を発症した症例群では、体重、LA/Ao、LVIDDN、大動脈遮断時間の有意な高値を認め、特にLVIDDNが心室細動の発生に密接に関わっていることが明らかとなった。また、心筋保護液としてBCPを使用した場合、CCP使用時と比較して有意に心室細動の発生率が減少した。術中の輸血使用量はBCP使用症例群において有意に少なかった。術後1ヵ月の時点での生存率と心臓サイズの縮小効果は心筋保護液の種類によって差は認められなかった。

[小括] 大動脈遮断解除後に発生する心室細動のリスク因子として体重、LA/Ao、LVIDDN、大動脈遮断時間の高値が指標となることが明らかとなった。また心筋保護液として BCP は CCP と同等の安全性が確認された。さらに BCP の使用は心室細動の発生率を低下させ、術中の輸血使用量を減らすことが明らかとなった。

【第 2 章】 僧帽弁修復術の術後に発生する横隔神経麻痺に関する検討

[目的] 横隔神経は主な呼吸筋である横隔膜を支配する重要な神経である。横隔神経の損傷は横隔神経麻痺の原因となり、横隔膜の機能障害をもたらす。本章では手術成績に関わる術中の合併症に続き、術後の合併症である横隔神経麻痺について発生率と回復時期、手術成績への影響について評価した。

[方法] 2014 年 8 月から 2017 年 3 月に僧帽弁修復術を実施した犬 284 例を対象とした。横隔神経麻痺の診断は、手術翌日の胸部 X 線検査で得た吸気時背腹像を用い、左側横隔膜が右側横隔膜より 1 肋間以上挙上した症例を横隔神経麻痺と診断した。回復時期については退院時、術後 1 ヶ月検診時、術後 3 ヶ月検診時で評価した。

[結果] 本章では、横隔神経麻痺の発生率は 30.3%であった。また術後 3 ヶ月の時点でほぼすべての症例で横隔神経麻痺の改善が認められた。横隔神経麻痺の有無は術後の死亡について有意な関連は認められなかった。しかし、死亡原因を呼吸不全とその他の死亡原因に分けた場合、呼吸不全で死亡した症例における横隔神経麻痺の発生率は有意に高値であった。さらに呼吸不全で死亡した症例の多くが術前に呼吸器疾患を有していたことが明らかとなった。

[小括] 横隔神経麻痺は発生率の高い合併症であるが、術後早期に改善することが明らかとなった。また横隔神経麻痺の手術成績への関与として、横隔神経麻痺は単独では直接的な死亡原因となる可能性は低いが、他の呼吸器疾患と合併した場合、術後の呼吸不全による死亡リスクを高めることが明らかとなった。

【第3章】 チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索

[目的] チワワは僧帽弁閉鎖不全症の好発犬種であることが知られている。また本研究の第1章、第2章において僧帽弁閉鎖不全症の外科治療を受けた症例の過半数がチワワであったことから、本章ではチワワに着目し、僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の調査を行った。

[方法] 本研究では7歳以上のチワワを対象とした。僧帽弁逆流の認められないまたは僧帽弁逆流は認められるものの、逆流量はごく軽度である個体を健常群とした。僧帽弁閉鎖不全症罹患群（MR群）は、重度の僧帽弁逆流が認められ、心拡大を呈したACVIM stage B2以降の症例を対象とした。それぞれの個体から得た末梢血液よりDNAを抽出し、健常群とMR群の塩基配列を比較することで原因候補遺伝子の探索を行った。調査した遺伝子多型はマルチーズにおいて僧帽弁閉鎖不全症との関連が報告されているSerotonin Transporter (SERT) 遺伝子、人において僧帽弁逸脱症との関連が報告されているXeroderma Pigmentosum Complementation Group C (XPC) 遺伝子、DCHS1 遺伝子について比較を行った。

[結果] SERT 遺伝子について、調査した全エクソン 13 領域において健常群と MR 群の塩基配列は同一であり、明らかな遺伝子多型は認められなかった。XPC 遺伝子においては 902 番目のアミノ酸においてアデニン-グアニンの遺伝子多型が認められたが、遺伝子多型の割合は健常群と MR 群で有意な差は認められなかった。またアデニン-グアニンの遺伝子多型により翻訳されるアミノ酸は同一であった。DCHS1 遺伝子において、エクソン 19 相当箇所には 2 つの遺伝子多型、エクソン 21 相当箇所には 1 つの遺伝子多型が認められた。認められた遺伝子多型のうち 1 つはアミノ酸の変化を生じるミスセンス変異であったが、健常群と MR 群でそれぞれの遺伝子多型の発生頻度の差は認められなかった。

[小括] XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子についてはチワワにおいて遺伝子多型が認められたが、僧帽弁閉鎖不全症との関連性は低いと考えられた。また本章では、チワワにおいて健常群と MR 群で SERT 遺伝子の塩基配列の差異は認められなかったことから、原因候補遺伝子は犬種により異なる可能性が示唆された。

【総括】

本研究は僧帽弁閉鎖不全症に対する外科手術の代表的な合併症のリスク因子、合併症が与える手術成績への影響について明らかにし、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症に関与する原因候補遺伝子を特定することを目的とした。

本研究の結果から、致死的な不整脈である大動脈遮断解除後に発生する心室細動

について、LVIDDN の高値が優れたリスク因子となることが明らかとなった。また心室細動の発生率を減少させる方法として心筋保護液に自己血液を混合する BCP の有用性が示され、BCP の使用は手術成績を向上させる新たな手技となることが示唆された。

呼吸不全は術後の主な死亡原因のひとつであるが、本研究から横隔神経麻痺は他の呼吸器疾患と合併することで呼吸不全による死亡リスクを高めることが明らかとなった。また横隔神経麻痺は高率で発生することが示され、横隔神経麻痺の発生を減らすことは術後の呼吸不全のリスクを下げることに繋がると考えられた。今回の研究では、横隔神経麻痺の原因を明らかにすることはできなかった。さらなる調査として、手術中のどのような操作が横隔神経麻痺の原因となるか明らかにすることが必要であると考えられた。

さらに、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を行った。本研究では SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子の遺伝子多型について検討したが、僧帽弁閉鎖不全症の発症にかかわると考えられる遺伝子多型を確認することはできなかった。

本研究の成果は、犬の僧帽弁閉鎖不全症の外科治療の手術成績の向上、合併症の発生率の低下に貢献すると考えられる。今後はさらにチワワの僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を進める。

Abstract

Introduction: In dogs, mitral valve degeneration (MVD) is the most common cause of acquired heart disease. MVD is common in small dogs, and its incidence is high in certain dog breeds. However, the genetic mechanisms underlying the development of MVD have not been elucidated, and no curative treatment has been performed. Treatment of MVD is usually medical, but in severe cases, secondary to congestive heart failure, surgery may be performed. The prognosis of MVD is limited in patients with congestive heart failure. In recent years, surgical treatment for MVD has been performed in dogs, and the prognosis has improved. However, to date, information on the risk factors and complications of surgical treatment of MVD is limited, and the impact on surgical outcomes is unknown.

The purpose of this study was to investigate the risk factors for complications and the effects of complications on surgical outcomes in order to improve the clinical outcomes of surgical treatment of MVD in dogs. Regarding the genetic aspect, we focused on Chihuahuas because they have a large population in Japan and account for a large proportion of dogs undergoing surgical treatment. Furthermore, we investigated possible genes responsible for MVD in Chihuahuas.

Chapter 1 Risk factors for ventricular fibrillation following aortic cross-clamping release during mitral valve repair in dogs

Background: Although hearts with ventricular fibrillation have electrical ventricular excitement, the pumping function is lost. If treatment is not immediately successful, fatal arrhythmia may develop. In this study, we investigated the risk factors for ventricular

fibrillation after releasing aortic cross-clamping, a fatal complication during surgery, with the aim of improving surgical outcomes.

Methods: A total of 237 dogs that underwent mitral valve repair from November 2015 to September 2017 were recruited. Crystalloid cardioplegia (CCP) or blood-CCP (BCP) obtained by mixing CCP with autologous blood at a ratio of 1:1 was used. The age, body weight, left atrial-to-aortic diameter ratio (LA/Ao), standardized left ventricular end-diastolic diameter (LVIDDN), aortic cross-clamping time, cardioplegia type, and cardioplegia dose as predictors of ventricular fibrillation were recorded. In addition, the effects of different myocardial protective solutions were evaluated by comparing the amount of transfusion used during surgery, survival rate 1 month after surgery, and effect of reducing the heart size.

Results: In the group of patients with ventricular fibrillation, body weight, LA/Ao, LVIDDN, and aortic block time significantly increased, and LVIDDN was closely related to the occurrence of ventricular fibrillation. When BCP was used as the cardioplegic solution, the incidence of ventricular fibrillation significantly reduced compared to when CCP was used. The incidence of intraoperative blood transfusion was significantly lower in the BCP group. One month postoperatively, the survival rate or reduction in the heart size did not differ between cardioplegia types.

Conclusion: High body weight, LA/Ao, LVIDDN, and aortic block time are risk factors for ventricular fibrillation after releasing aortic cross-clamping. For cardioplegia, BCP was confirmed to be as safe as CCP. Furthermore, the use of BCP reduced the incidence of ventricular fibrillation and intraoperative blood transfusion.

Chapter 2 Unilateral diaphragmatic paralysis following mitral valve repair in dogs

Background: The phrenic nerve innervates the diaphragm, the main respiratory muscle. Damage to the phrenic nerve causes unilateral diaphragmatic paralysis (UDP), resulting in diaphragmatic dysfunction. In this study, we evaluated the incidence and recovery time of UDP, which is a postoperative complication, as well as the effect on survival outcomes following intraoperative complications.

Methods: The subjects were 284 dogs who underwent mitral valve repair from August 2014 to March 2017. In an inspiratory dorsoventral image obtained with chest X-ray the day after operation, if the left diaphragm was raised more than one intercostal level from the right diaphragm, the patient was diagnosed with UDP. The recovery time was evaluated at the time of discharge from the hospital 1 month postoperatively and at the 3-month follow-up.

Results: In this study, the incidence of UDP was 30.3%. Almost all cases of UDP had improved 3 months postoperatively. The presence/absence of UDP was not significantly associated with postoperative death. However, the incidence of UDP was significantly higher among patients who died of respiratory failure than among patients who died of other causes. Furthermore, many patients who died of respiratory failure had respiratory disease before surgery.

Conclusion: Although the incidence of UDP is high after mitral valve repair, there is early improvement. The involvement of UDP in the surgical results is unlikely to be a direct cause of death, but combined with other respiratory diseases, patients are at high risk of death due to postoperative respiratory failure.

Chapter 3 Search for candidate genes for mitral regurgitation in Chihuahua

Background: Mitral regurgitation (MR) is common in the dog breed Chihuahua. Furthermore, in the studies reported in chapters 1 and 2, most patients who underwent surgical treatment for MVD were Chihuahuas. Therefore, the aim of this study was to perform a survey of candidate genes for MR in Chihuahuas.

Methods: In this study, we recruited Chihuahuas aged 7 years or older. Participants without MR or with minimal MR were considered healthy. The MR group comprised patients with severe MR and cardiac expansion after developing American College of Veterinary Internal Medicine stage B2. DNA was extracted from peripheral blood of each individual, and nucleotide sequences of the healthy and MR groups were compared to search for a candidate gene for the cause. Polymorphisms were investigated in the serotonin transporter (SERT) gene, which is associated with MR in Maltese dogs, and the xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC) and DCHS1 genes, which are associated with mitral valve prolapse in humans, were compared.

Results: Regarding SERT, the nucleotide sequences of the healthy and MR groups were the same in all exon 13 regions examined, and no apparent gene polymorphism was observed. In XPC, an adenine-guanine polymorphism was observed at the 902nd amino acid, but the polymorphism ratio was not significantly different between the healthy and MR groups. The amino acids translated by the adenine-guanine polymorphism were the same. In DCHS1, two gene polymorphisms were found in exon 19 equivalents, and one gene polymorphism was found in exon 21 equivalents. One of the observed polymorphisms was a missense mutation that caused an amino acid change, but there were no differences in the percentage of

polymorphisms between the healthy and MR groups.

Conclusion: Genetic polymorphisms of XPC and DCHS1 were observed in Chihuahuas, but their associations with MR were considered to be low. In addition, in this study, no difference in the nucleotide sequence of SERT was observed between the healthy and MR groups in Chihuahuas, suggesting that the candidate gene may differ across dog breeds.

Summary: We demonstrated the risk factors for typical complications of MVD surgery and effects of complications on surgical outcomes and identified candidate genes associated with MR in Chihuahuas. High levels of LVIDDN were an excellent risk factor for ventricular fibrillation following aortic cross-clamping release, a fatal arrhythmia. BCP, which mixes autologous blood with myocardial protective fluid, was found to be an effective method to reduce the incidence of ventricular fibrillation. The use of BCP was a new technique suggested to improve surgical outcomes.

Although respiratory failure is known to be a major cause of postoperative death, this study revealed that UDP combined with other respiratory diseases increases the risk of death from respiratory failure. In addition, UDP occurred at a high rate, and reducing the occurrence of phrenic palsy may have reduced the risk of postoperative respiratory failure. The cause of UDP could not be established in this study. Future studies should be performed to clarify which surgical manipulations cause UDP.

In addition, we searched for candidate genes for MR in Chihuahua. We examined polymorphisms in SERT, XPC, and DCHS1. However, we found no polymorphisms that may be involved in the development of MR.

The results of this study could contribute to improving the surgical outcome of MVD in dogs and reducing the incidence of complications. In the future, we will continue to search for candidate genes for MR in Chihuahuas.

目次

	項
序文	17
第1章 犬の僧帽弁修復術における大動脈遮断解除後に発生する心室細動に関する検討	21
1. 緒言	23
2. 材料と方法（後日公開）	23
3. 結果（後日公開）	23
4. 考察（後日公開）	23
5. 小括（後日公開）	23
第2章 犬の僧帽弁修復術後に発生する横隔神経麻痺に関する検討	24
1. 緒言	25
2. 材料と方法	26
3. 結果	29
4. 考察	31
5. 小括	34

第3章 チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症と SERT 遺伝子に関する検討	35
1. 緒言	36
2. 材料と方法	38
3. 結果	41
4. 考察	44
5. 小括	46
総括	47
謝辞	50
引用文献	51
表（一部後日公開）	62
図	67

序文

犬において、僧帽弁閉鎖不全症は後天性心疾患の中で最も発生率の高い疾患である(Fox et al., 1999)。僧帽弁閉鎖不全症は小型犬で多く認められ、性差や犬種特異性があることから(Keene et al., 2019)、疾患の発生に遺伝的な関与が考えられている。過去に計画的な繁殖を行うことで僧帽弁閉鎖不全症の発症年齢を遅らせるとの報告や(Birkegard et al., 2016)、僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子に関する研究が行われてきたが(Meurs et al., 2018, French et al., 2012, Stern et al., 2015)、僧帽弁閉鎖不全症の遺伝的なメカニズムは解明されておらず、根治治療は行われていないのが実際である。僧帽弁閉鎖不全症の治療は内科治療が一般的であるが(Keene et al., 2019)、重症例の場合、うっ血性心不全を続発する。うっ血性心不全を発症した症例では、予後が制限されることが明らかとなっている(Haggstrom et al., 2008)。近年、犬においても僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療が行われるようになり(Uechi, 2012)、外科治療により予後の改善が可能となった(Uechi et al., 2012, Mizuno et al., 2013)。

人の僧帽弁閉鎖不全症の外科治療は僧帽弁形成術と僧帽弁置換術が行われている(Enriquez-Sarano et al., 2009)。僧帽弁形成術は人工弁を使用する僧帽弁置換術と比べると院内死亡率の低値、人工弁の機能不全や感染症などの合併症を回避することが可能である(Thourani et al., 2003)。また長期的な抗血栓療法が必要がないという利点もあり、犬の僧帽弁閉鎖不全症の外科治療として僧帽弁修復術が選択されることが多い。僧帽弁閉鎖不全症の手術死亡率に関わる合併症は心不全、出血、心内膜炎、呼吸不全、血栓塞栓症、腎不全などが報告されている(Reisman et al., 2019, Christakis et al., 1985)。しかし、犬における僧帽弁閉鎖不全症の外科治療に関わるリスク因子

や合併症に関する情報は少なく、これらの手術成績への影響は不明である。

大動脈遮断解除に発生する心室細動は術後の心不全に関連する重要な心臓手術の合併症の1つである。大動脈の遮断解除後に発生する心室細動は心筋細胞の虚血および虚血再灌流障害に起因していると考えられ(Manning and Hearse, 1984)、心筋酸素消費量、心筋壁張力、および心筋内アシドーシスの増加が原因とされている(Mauermann et al., 2012)。心室細動が発生した場合、治療として電氣的除細動が行われるが、電氣的除細動は心筋障害を招き、術後の心機能の低下や不整脈の原因となることが報告されている(Doherty et al., 1979, Yamaguchi et al., 2002)。

横隔神経麻痺は呼吸機能に影響する心臓手術の合併症であるが、乳児や小児で発生した場合、重篤な呼吸障害につながるということが知られている(Affatato et al., 1988, Haller et al., 1979, de Leeuw et al., 1999)。横隔神経麻痺が与える術後への影響として、動脈血酸素分圧の低下、集中治療期間や入院期間の延長が報告されており(Fujimura et al., 1995, Lemmer et al., 2006)、小児心臓外科では、術後の呼吸不全のリスク因子となることが明らかになっている(Amin et al., 2001, Bandla et al., 1999, de Leeuw et al., 1999)。

そこで本研究では、犬の僧帽弁修復術の手術成績の向上を目的に、術後の心不全と呼吸不全に密接に関わると考えられる大動脈遮断解除後に発生する心室細動（第1章）、術後に発生する横隔神経麻痺（第2章）について検討した。

本研究ではさらに僧帽弁閉鎖不全症の根治治療を実現するため、疾患の発生メカニズムの解明を目的に僧帽弁閉鎖不全症に関与する原因候補遺伝子の調査を実施した（第 3 章）。僧帽弁閉鎖不全症の好発犬種の中でも、世界的に僧帽弁閉鎖不全症の発生が多く、臨床的に遭遇する機会が多いチワワに着目し、検討を行った。

第 1 章

犬の僧帽弁修復術における大動脈遮断解除後に発生する
心室細動のリスク因子の検討

1. 緒言

心室細動は迅速で無秩序な心室調律により、心室筋の同調性が失われた病態である(Hall and Ebooks Corporation, 2013)。心室細動時は電氣的な心室の興奮は認められるものの、心臓のポンプ機能は失われた状態であり、すみやかに治療が成功しない場合、致死性の不整脈である。心臓手術における心室細動は、心停止中の心筋虚血や虚血再灌流障害が原因となり、人での発生率は 11～80%と報告されている(Fiore et al., 1990, Baraka et al., 2000, Mita et al., 2019)。術中に心室細動が発生した場合、治療として電氣的除細動が行われるが、これは成功が確実である治療法ではない。また、電氣的除細動は心筋障害につながり、術後の心機能の低下や不整脈の原因となることが報告されている(Doherty et al., 1979, Yamaguchi et al., 2002)。そのため、大動脈遮断解除後に発生する心室細動の発生を予測するリスク因子を明らかにすることは予後の推定に役立ち、心室細動の発生を減少させることは手術成績の向上につながると考えられる。

本研究の目的は、犬の僧帽弁修復術において、大動脈遮断解除後に発生する心室細動の発生率およびリスク因子を明らかにするとともに、術中の心筋保護に重要な役割を担う心筋保護液に着目し、心筋保護液の種類の違いによる手術に与える影響を評価することである。

2. 材料と方法

後日公開

3. 結果

後日公開

4. 考察

後日公開

5. 小括

詳細は後日公開とするが、犬における僧帽弁修復術の術中の致死的な合併症のひとつである大動脈遮断解除後に発生する心室細動について、LVIDDN が術前のリスク因子となることが明らかとなった。また心筋保護液として血液カルディオプレジアを使用することは、晶質液カルディオプレジアと比較し、大動脈遮断解除後の心室細動の発生を減少させ、血液希釈効果が小さいことから小型犬に適した心筋保護液であることが示された。

第2章

犬の僧帽弁修復術後に発生する横隔神経麻痺の
術後生存率への影響に関する検討

1. 緒言

横隔神経は主な呼吸筋である横隔膜を支配する重要な神経のひとつである(Laghi and Tobin, 2003)。横隔神経の損傷は横隔膜の機能不全につながり、横隔膜の片側または両側の麻痺を引き起こすことが知られている。横隔神経麻痺は外傷、神経疾患、内分泌疾患、腫瘍の横隔神経への浸潤や圧迫など様々な原因により発生するが(Ricoy et al., 2018)、心臓手術の合併症としての発生も報告されている(Gaissert and Wilcox, 2016)。横隔神経麻痺は胸部 X 線検査により横隔膜の吸気時の挙上として検出され、X 線透視検査や超音波検査で診断される(Joho-Arreola et al., 2005, Nason et al., 2012, Gerscovich et al., 2001)。横隔神経麻痺は動脈血酸素分圧の減少の原因となり、人工呼吸管理時間の延長や集中治療管理期間の延長に関与する(Fujimura et al., 1995, Lemmer et al., 2006)。また横隔神経麻痺は術後の呼吸不全の予後因子となることが明らかとなっている。(Amin et al., 2001, Bandla et al., 1999, de Leeuw et al., 1999)。

獣医療において、横隔神経麻痺に関する報告はほとんどなく、心臓手術の合併症として、横隔神経麻痺が手術成績に与える影響は不明である。本研究の目的は、犬の僧帽弁修復術における横隔神経麻痺の発生率、回復時期、死亡原因との関連を評価し、横隔神経麻痺の手術成績への影響を明らかにすることである。

2. 材料と方法

本研究は日本どうぶつ先進医療研究所株式会社臨床研究倫理委員会の承認を得て、実験指針に基づき行われた（承認番号：170420-3）。

(1) 症例

2014年8月から2017年3月までにJASMINE どうぶつ循環器病センターを受診し、当施設で僧帽弁閉鎖不全症の治療のため僧帽弁修復術を実施した犬を対象に回顧的に調査を実施した。僧帽弁修復術は過去にうっ血性心不全の発症歴のある症例または将来的にうっ血性心不全を発症する可能性が高いと判断された症例を適応とした。本研究は初回の僧帽弁修復術時の臨床データのみを対象とし、再手術時の臨床データは除外した。

(2) 僧帽弁修復術

僧帽弁修復術は第1章の症例と方法の(2)と同様の術式を行なった。開胸はすべての症例において左肋間アプローチを実施した。また心膜切開の手技は、心膜の切開部位は横隔神経の腹側とし、心膜の血管を電気メスで止血し、電気メスまたは剪刀を用いて心膜を切開した。術後は酸素室ケージで管理し、吸入酸素濃度を40～25%で管理した期間を集中治療期間とした。酸素ケージから離脱し、一般状態の改善が認められた時点で退院とした。

(3) 横隔神経麻痺の診断

横隔神経麻痺の診断は胸部 X 線検査により行なった。手術翌日の胸部 X 線検査吸気時背側像で、横隔膜左脚が右脚よりも 1 肋間以上挙上が認められた場合、横隔神経麻痺と診断した (図 1)。また術前の時点で横隔膜の高さに左右差を認めた症例では、術前と比較し横隔膜左脚が 1 肋間以上挙上を認めた場合、横隔神経麻痺と診断した。すべての症例で術前、手術翌日、退院時、術後 1 ヶ月、術後 3 ヶ月の時点で胸部 X 線検査を実施し、各検査時点での横隔神経麻痺の有無を評価した。

(4) 手術成績

手術成績は退院率、術後 3 ヶ月の時点での生存率を評価した。死亡原因について、呼吸不全は努力呼吸を呈し、低酸素血症があり、酸素療法で改善が認められず死亡した症例と定義した。低酸素血症は経皮的酸素飽和度を用いて評価し、経皮的酸素飽和度が 90%以下で低酸素血症と診断した。

(5) 統計学的解析

全てのデータは Shapiro Wilk 検定を用いて正規性を評価した。連続変数データはデータの分布により平均値 ± 標準偏差または中央値 (最小-最大) で表記した。横隔神経麻痺の有無について、連続変数の比較はマン・ホイットニーの U 検定を用いた。横隔神経麻痺の有無と 2 項変数データとの関連についてはカイ 2 乗検定またはフィッシャーの正確確率を使用し、集中治療期間、入院期間、死亡日数、死亡原因

との関連については2項ロジスティック回帰分析を行なった。各検定結果は $p < 0.05$ で統計学的有意差があるものとみなした。全ての統計解析は IBM SPSS Statistics version 24.0 for Mac (エス・ピー・エス・エス株式会社、シカゴ、アメリカ) を用いて行なった。

3. 結果

本研究で対象となった症例は 294 頭であった。この中で手術終了時から手術翌日の胸部 X 線検査実施までに死亡した 10 頭を除いた 284 頭について調査を行なった。犬種の割合はチワワが最も多く (n=133)、キャバリア・キングチャールズ・スパニエル (n=26)、トイ・プードル (n=21)、ポメラニアン (n=19)、シー・ズー (n=13)、マルチーズ (n=12)、ミニチュア・ダックスフンド (n=11)、その他純犬種 (n=29)、雑種 (n=20) が含まれた。術前の体重、年齢、胸部 X 線検査、心臓超音波検査データ、手術中データは表 5 に示した。

横隔神経麻痺は 284 頭中 86 頭で診断し、発生率は 30.3%であった。横隔神経麻痺はすべて左側で認められた。集中治療期間は横隔神経麻痺罹患群で 4 日 (2 - 9 日)、横隔神経麻痺非罹患群は 3 日 (2 - 18 日) であり、2 群間で有意な差は認められなかった ($p = 0.166$)。入院期間においても、横隔神経麻痺罹患群は 6 日 (4 - 14 日)、横隔神経麻痺非罹患群は 6 日 (4 - 32 日) と 2 群間で明らかな差は認められなかった ($p = 0.177$)。また集中治療期間および入院期間の長さは横隔神経麻痺の有無に影響されなかった (OR: 1.07, CI: 0.88 - 1.23 および OR: 0.95, CI: 0.83 - 1.08)。横隔神経麻痺の罹患数および罹患率は退院時には 64 頭 (22.5%)、術後 1 ヶ月検診時には 23 頭(8%)、術後 3 ヶ月検診時では 1 頭(0.3%)であった。

手術成績として、手術翌日から退院までに 21 頭が死亡した。この 21 頭のうち横隔神経麻痺を罹患していた症例は 10 例であった。横隔神経麻痺と院内死亡率に明らかな関連性は認められなかった (OR: 2.20, CI: 0.89 - 5.39)。死亡した 21 頭の原因

は呼吸不全が 9 頭、血栓塞栓症が 4 頭、心不全、不整脈、膵炎、敗血症がそれぞれ 1 頭であった。4 頭の症例では明らかな死亡原因は不明であった。呼吸不全で死亡した 9 頭のうち 8 頭で横隔神経麻痺の罹患が認められた。死亡原因を呼吸不全とそれ以外の死亡で分類した結果、横隔神経麻痺の罹患は呼吸不全死亡症例で有意に多いことが認められ ($p=0.002$)、横隔神経麻痺は呼吸不全と有意な関連が認められた ($OR: 10.5, CI: 1.36-81.0, p=0.024$)。横隔神経麻痺と死亡、集中期間、入院期間との関連を表 6 に示す。また呼吸不全で死亡した 9 頭のうち、7 頭は咽頭気道閉塞症候群、重度の気管虚脱、肺水腫、肺ブラを有していた (表 7)。

退院後 6 頭の症例で死亡が認められた。死亡原因は 5 頭が突然死であり、1 頭が心不全であった。全体の手術成績について、術後 3 ヶ月の時点で 37 頭の死亡が認められ、生存率は 87.4% (37 / 294) であった。

4. 考察

本研究において、横隔膜麻痺は僧帽弁修復術を受けた犬の約 30%で認められた。医学領域では、心臓手術後に発生する横隔神経麻痺の発生率は 0.8~12%と報告されており(Amin et al., 2001, Bandla et al., 1999, de Leeuw et al., 1999, Mok et al., 1991, van Onna et al., 1998)、犬において術後の横隔神経麻痺は発生率の高い合併症であることが明らかとなった。医学領域では、術中の横隔神経の切断や挫滅、横隔神経の伸張または開心術中における心筋保存のための心臓の局所冷却によって誘発される横隔神経の損傷が横隔神経麻痺の原因と考えられている(Lemmer et al., 2006)。その中でも心臓の局所冷却に伴う横隔神経への寒冷刺激が横隔神経麻痺の主原因といわれている(Dimopoulou et al., 1998)。しかし、本研究では、開心術中の心臓の局所冷却として氷や生理食塩水を使用した症例はごく少数であった。また横隔神経麻痺は成人と比べ小児で発生率が高く、肋間開胸による低侵襲心臓手術では、胸骨正中切開よりも横隔神経麻痺の発生率が高いことが知られている(Cheng et al., 2011)。本研究で対象となった症例はすべて左肋間アプローチによる開胸法を選択した。また本研究の症例の体重はほとんどが 5 kg 未満と小型であり、開胸方法と症例の大きさの違いは本研究で横隔神経麻痺の発生率が高かったことの要因となる可能性が考えられた。本研究では横隔神経の損傷につながる手術手技を特定することはできなかった。犬の僧帽弁修復術における横隔神経を温存する手術手技の確立にはさらなる調査が必要であると考えられる。

本研究では、横隔神経麻痺を罹患した症例の半数以上が手術から 1 か月以内に横

隔神経麻痺の回復が認められた。さらに手術後3か月以内のほぼすべての症例で横隔神経麻痺の回復が確認された。人では横隔神経麻痺の術後の回復に必要な時間は5～12ヵ月であることから(Amin et al., 2001, Bandla et al., 1999, de Leeuw et al., 1999, Mok et al., 1991, van Onna et al., 1998)、犬の僧帽弁修復術後に発生する横隔神経麻痺は比較的早期に回復することが明らかとなった。このことから人における横隔神経麻痺の原因と本研究で発生した横隔神経麻痺の原因は異なる可能性が考えられた。

横隔神経麻痺の有無は、術後の生存率、集中治療期間、入院期間との直接的な関連は認められなかった。しかし呼吸不全で死亡した9頭のうち8頭で横隔神経麻痺が認められ、横隔神経麻痺は呼吸不全と関連していることが明らかとなった。また呼吸困難で死亡した症例の多くが術前から他の呼吸器疾患を併発していた。呼吸不全で死亡した9匹の犬のうち4匹がチワワであったが、その4頭のうち3頭は、術前から上気道閉塞を有していた。上気道閉塞は、イングリッシュブルドッグ、パグ、ボストンテリアなどの短頭犬で一般的に観察されるが(Packer and Tivers, 2015, Emmerson, 2014)、チワワやシーズーにおいても上気道や咽頭気道の閉塞の素因を持つことが報告されている(Dupre and Heidenreich, 2016)。これらの犬は頭蓋が頭尾側方向に短くなり、咽頭に過剰な軟組織が生じる特徴を有している(Emmerson, 2014)。上気道閉塞を有する犬では動脈血酸素分圧の減少と動脈血二酸化炭素分圧の上昇が報告されており(Hoareau et al., 2012)、本研究のチワワの一部は、術前および術後の上気道閉塞によって吸気努力が生じ、同様の影響を受けた可能性が考えられた。

また重度の気管虚脱や肺水腫を有した症例も術後の呼吸不全の原因のひとつとなったと考えられた。以上のことから、横隔神経麻痺は単独では呼吸機能への影響は小さいが、他の呼吸器疾患と合併することで術後の呼吸不全による死亡リスクの増加に関連することが示唆された。

5. 小括

横隔神経麻痺は犬の僧帽弁修復術において発生率の高い合併症であることが明らかとなった。横隔神経麻痺の手術成績への影響として、横隔神経麻痺は単独では術後の死亡原因となる可能性は低いが、他の呼吸器疾患と合併した場合、呼吸不全による死亡リスクを高めることが示された。

第3章

チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索

1. 緒言

犬における僧帽弁閉鎖不全症の罹患率は年齢と品種に関連していることが知られている。好発犬種として挙げられるのはキャバリア・キングチャールズ・スパニエル、ダックスフンド、ミニチュア・トイプードルなどであるが、本研究の第1章、第2章において、僧帽弁修復術を受けた犬種の中で最も頭数の多かったものはチワワであり、約半数を占めていた。チワワは日本における人気犬種のひとつであるが、他の人気犬種であるプードルやダックスフンドと比べても僧帽弁修復術を受けた頭数は多く、チワワも僧帽弁閉鎖不全症の好発犬種であると言える。これまで様々な犬種と僧帽弁閉鎖不全症の遺伝的な関連について調査が行われてきたが、明らかな原因遺伝子の特定には至っていない。また過去にチワワと僧帽弁閉鎖不全症の関連を調査した研究はなく、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の遺伝的な背景は不明である。

セロトントランスポーター (SERT) 遺伝子は様々な心血管障害との関連が報告されているセロトニンの機能調整を担う SERT の合成に関与している遺伝子である (Levy et al., 2008)。SERT 遺伝子の発現量は臨床症状を呈した僧帽弁閉鎖不全症の犬で上昇していること (Cremer et al., 2015)、セロトニンの投与により誘発される弁の組織学的な変化と僧帽弁閉鎖不全症の犬の弁の構造が類似していることから (Darmon et al., 2015, van den Berg et al., 2005)、犬の僧帽弁閉鎖不全症に SERT 遺伝子が関連していると考えられている。また僧帽弁閉鎖不全症の犬では血清中、血小板、僧帽弁、左心室組織中においてもセロトニン濃度が上昇していることが報告されて

いることから(Arndt et al., 2009, Cremer et al., 2014)、犬において僧帽弁閉鎖不全症の病態にセロトニンが深く関わっていることが示唆されている。

XPC 遺伝子は、細胞増殖とアポトーシスのバランスを維持する重要な役割を果たしている遺伝子である(Sugasawa et al., 1998, Legerski and Peterson, 1992, Li et al., 1996)。XPC 遺伝子は細胞増殖とアポトーシスのバランスを維持する上で重要な役割を担い(Wang et al., 2004)、XPC 遺伝子多型は、p53 または p53 に依存しないアポトーシス経路の活性化を介して、DNA 損傷を促進することが知られている(Adimoolam and Ford, 2002)。人において、心臓におけるアポトーシス経路の活性は大動脈弁疾患や僧帽弁疾患などの心臓弁膜疾患の発症に関係することが明らかとなっており、XPC 遺伝子多型は僧帽弁逸脱症のリスクを増加させることが報告されている(Yigin et al., 2015)。

DCHS1 遺伝子は人の僧帽弁逸脱症患者を含む多世代家系の調査により発見され、遺伝性の非症候性の僧帽弁逸脱症の発症に関与していると考えられている遺伝子である(Durst et al., 2015)。

本章ではチワワの僧帽弁閉鎖不全症の遺伝的な背景を明らかにすることを目的に、犬において僧帽弁閉鎖不全症との関連が認められている SERT 遺伝子、人において僧帽弁逸脱症との関連が報告されている XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子について検討を行なった。

2. 材料と方法

(1) 対象

7歳以上のチワワを本研究の対象とし、健常群と僧帽弁閉鎖不全症罹患群で SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子の遺伝多型の有無、遺伝子多型の発生頻度について比較を行なった。健常群は聴診で心雑音が認められない、または左側心尖部を最強点とする心雑音が聴取されたが心雑音の強度は grade 1 以下、心臓超音波検査で僧帽弁逆流は認められるが、逆流量はごく軽度であった個体を健常群とした。僧帽弁閉鎖不全症罹患群は、重度の僧帽弁逆流が認められ、心拡大を呈した ACVIM stage B2 以降の症例を対象とした。検体はそれぞれの個体から得た末梢血液を使用した。採血量は 0.5 ml であり、検体は採血後すみやかに EDTA-2Na 採血管に注入し、-20°Cで冷凍保管を行った。

(2) DNA 抽出

Pure gene® Blood Core Kit A (QIAGEN)を用い、添付のマニュアルに従って末梢血液検体から DNA の抽出を行った。一部検体については血液量がマニュアルの 300µL 以下だったため、採血されていた全量(100µL~300µL)を用いた。DNA の最終溶媒には滅菌蒸留水 100µL を用いた。

(3) 調査した遺伝子領域

SERT 遺伝子について、塩基配列の比較領域はタンパク質の合成に関与に大きく関わるエクソン部分について実施した。XPC 遺伝子については人で僧帽弁逸脱症との関連が報告されている 939 番目のアミノ酸の遺伝子多型に着目し、犬において同部位を含む 16 番目のエキソンについて塩基配列の比較を行なった。DCHS1 遺伝子についても同様に、人で遺伝子多型が報告されている 19、21 番目のエクソンの相当部位を含むようプライマーを設計し、塩基配列の調査を行った。

(4) PCR 反応及びシーケンスによる塩基配列の決定

使用したプライマー配列とそれぞれのアニーリング温度・伸長反応時間は表 8 に記載した。PCR 反応は Ex Taq® Hot Start Version (TAKARA BIO) を用い、添付のマニュアルに従って初期熱変性を 95°C 3 分間行った後、熱変性を 95°C 30 秒間、表 1-3 に記載したプライマーごとのアニーリング温度で 30 秒間、伸長反応を 72°C で表 1 に記載したプライマーごとの伸長時間のセットを 35 サイクル行い、最終反応として伸長反応 72°C 3 分間の条件で行った。

PCR 産物 5 μ L と 10 \times Loading Buffer (TAKARA BIO) 1 μ L を混合したものを、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、UV ライトにより可視化して目的の増幅産物が得られているかを確認した。

増幅産物の確認後、PCR 産物を exonuclease I (Wako) と shrimp alkaline

phosphatase (TAKARA BIO) を用いて精製した。Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)によってサイクルシーケンスを用い、Big Dye® X Terminator™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)によって配列を決定した。

(5) 統計学的解析

健常群と僧帽弁閉鎖不全症罹患群の遺伝子多型の発生頻度の比較は、ピアソンのカイ2乗検定を用いた。検定結果は $p < 0.05$ で統計学的有意差があるものとみなした。

統計解析は IBM SPSS Statistics version 24.0 for Mac (エス・ピー・エス・エス株式会社、シカゴ、アメリカ) を用いて行なった。

3. 結果

今回の検討に用いた検体は健常群が 17 頭、僧帽弁閉鎖不全症罹患群は 18 頭であった。僧帽弁閉鎖不全症罹患群の重症度の内訳は ACVIM stage B2 が 6 頭、stage C が 7 頭、stage D が 5 頭であった。僧帽弁閉鎖不全症罹患群の中で僧帽弁修復術を実施した症例は 17 頭であった。

(1) SERT 遺伝子

SERT 遺伝子のエクソン領域の全 13 領域の塩基配列の比較を行なった。健常群と僧帽弁閉鎖不全症罹患群において SERT 遺伝子のエクソン領域の塩基配列の差異は認められなかった。また得られた塩基配列は National Center for Biotechnology Information に登録されている犬の XPC 遺伝子の同部位と塩基配列は一致が認められた。

(2) XPC 遺伝子

939 番目のアミノ酸を構成する塩基配列は健常群、僧帽弁閉鎖不全症罹患群ともに同一の塩基配列であり、遺伝子多型は認められなかった。同部位から翻訳されるアミノ酸はリジンであり、これは人における XPC 遺伝子 939 番目のアミノ酸と同じであった。

また同エクソン内の 902 番目のアミノ酸を構成する塩基配列においてアデニン-グアニンの遺伝子多型が認められた。遺伝子多型の割合は健常群 (AA = 7、GA = 7、

GG=3)、僧帽弁閉鎖不全症罹患群 (AA=7、GA=8、GG=3) で明らかな差は認められなかった ($p=0.981$)。またアデニンからグアニンへ変化が生じた場合でも翻訳されるアミノ酸の変化は生じないサイレント変異であった。XCP 遺伝子多型は僧帽弁逸脱症との関連していることから、僧帽弁閉鎖不全症罹患群において、僧帽弁修復術の術中所見で得た腱索断裂の有無によりさらに群分けを行い比較した。腱索断裂なし群 5 例、腱索断裂あり群は 13 例であった。この 2 群間における遺伝子多型の比較においても腱索断裂なし群 (AA=0、GA=4、GG=1) と腱索断裂あり群 (AA=7、GA=4、GG=2) で明らかな差は認められなかった ($p=0.090$)。

(6) DCHS1 遺伝子

DCHS1 遺伝子の遺伝子多型はエクソン 19 領域に 2 箇所、エクソン 21 領域に 1 箇所認められた。エクソン 19 領域について、遺伝子多型は 195 番目と 268 番目のアミノ酸を構成する塩基配列で認められ、195 番目はサイレント変異、268 番目は翻訳されるアミノ酸の変化が起きるミスセンス変異であった。268 番目のミスセンス変異が生じた場合、アミノ酸はセリンからフェニルアラニンへの変化が認められた。195 番目の遺伝子多型の割合は健常群で CC=10、CT=4、TT=0、僧帽弁閉鎖不全症罹患群で CC=10、CT=3、TT=1 であった ($p=0.565$)。268 番目の遺伝子多型の割合は健常群で CC=10、CT=2、TT=2、僧帽弁閉鎖不全症罹患群で CC=13、CT=1、TT=0 であった ($p=0.256$)。195 番目および 268 番目の遺伝子多型の割合の変化は健常群と僧帽弁閉鎖不全症罹患群で有意な差は認められなかった。エ

クソン 21 相当部位について、遺伝子多型は 191 番目の塩基で認められ、サイレンス変異であった。遺伝子多型の割合は健常群で CC=1、CT=0、TT=13、僧帽弁閉鎖不全症罹患群で CC=1、CT=1、TT=13 であり、191 番目の遺伝子多型の割合の変化は健常群と僧帽弁閉鎖不全症罹患群で有意な差は認められなかった ($p=0.595$)。

4. 考察

セロトニントランスポーター (SERT) の遺伝子変異は血中セロトニン濃度の上昇に関与し、人やマウスにおいて心臓弁膜症の発生に関連することが示唆されている (Gustafsson et al., 2005, Levy et al., 2008)。またマルチーズにおいては SERT 遺伝子のエクソン 3、4、5、7、9 において遺伝子多型が報告されており (Lee et al., 2018)、僧帽弁閉鎖不全症の関連が示唆されている。本研究では SERT 遺伝子の全エクソン領域について調査を行なったが、チワワにおいて SERT 遺伝子多型は認められなかった。このことから、チワワとマルチーズとで僧帽弁閉鎖不全症に関与する遺伝的な要因が異なる可能性が考えられた。

XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子は人で僧帽弁逸脱症との関連が報告されている。本研究では、人で報告されている遺伝子多型領域に相当する部分について塩基配列の調査を行なった。XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子ともにチワワで遺伝子多型が確認されたが、僧帽弁閉鎖不全症との関連は認められなかった。その要因として、人と犬では僧帽弁の粘液腫様性変化の病理組織像が異なる点や (Markby et al., 2017)、犬の僧帽弁閉鎖不全症は原発性に弁の変性が起こる疾患であるのに対し (Fox, 2012)、人では他の疾患に起因した二次的な僧帽弁の変性が原因となって僧帽弁閉鎖不全症が発症することが多い (Enriquez-Sarano et al., 2009)。このような病気の発生の違いが、人と犬で僧帽弁閉鎖不全症の遺伝的な関与の差につながっている可能性が考えられた。

今後はさらに症例数を増やして比較を行うとともに、チワワと他の犬種での比較を行い、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の遺伝的な背景の解明を行いたいと考える。

5. 小括

本研究ではチワワにおける SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子の遺伝子多型について僧帽弁閉鎖不全症との関連について調査した。チワワにおいて XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子の遺伝子多型が確認された。遺伝子多型は合計で 4 箇所認められ、そのうち 1 つはアミノ酸の変化を伴うものであったが、健常群、僧帽弁閉鎖不全症罹患群で遺伝子多型の発生の頻度の差は認められなかった。本研究ではチワワにおいて僧帽弁閉鎖不全症と SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子との関連性は認められなかった。

総括

犬の僧帽弁閉鎖不全症に対する治療は内科治療が一般的であるが、近年では外科治療が行われるようになり、予後の延長や投薬数を減らすことが可能となった。しかし、犬における僧帽弁閉鎖不全症の外科治療に関する情報は少なく、合併症の発生頻度や、手術成績に与える影響は不明である。本研究は僧帽弁閉鎖不全症に対する外科手術の代表的な合併症のリスク因子、合併症が与える手術成績への影響について明らかにし、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症に関与する原因候補遺伝子を特定することを目的とした。

第1章では術中の致命的な不整脈であり、術後の心機能の低下に関連する大動脈遮断解除後に発生する心室細動について、体重標準化左心室拡張末期径の高値が優れたリスク因子となることを明らかにした。また心室細動の発生率を減少させる方法として、心筋保護液に自己血液を混合する血液カルディオプレジアの有用性を示し、血液カルディオプレジアは手術成績を向上させる新たな手技となることが示唆された。

呼吸不全は術後の主な死亡原因のひとつである。第2章では、術後に発生する横隔神経麻痺は他の呼吸器疾患と合併することで呼吸不全による死亡リスクが高まることを明らかとした。また横隔神経麻痺は犬の僧帽弁修復術において発生頻度の高い合併症であることが示され、横隔神経麻痺の発生を減らすことは術後の呼吸不全のリスクを下げることに繋がると考えられた。今回の研究では、横隔神経麻痺の原因を明らかにすることはできなかった。さらなる調査として、どのような手術操作が横隔神経麻痺の原因となるか明らかにすることが必要であると考えられた。

さらに、第3章としてチワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を行った。本研究では SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子の遺伝子多型について検討したが、僧帽弁閉鎖不全症の発症にかかわると考えられる遺伝子多型を確認することはできなかった。

本研究の成果は、犬の僧帽弁閉鎖不全症の外科治療の手術成績の向上、合併症の発生率の低下に貢献すると考えられる。今後はさらにチワワの僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を進める。

本論文の一部は、以下に公表した

Mamada, K., Chen, A., Takamura, K., Murakami, M., Uechi, M: Unilateral diaphragmatic paralysis associated with surgical mitral valve repair in dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2020; 29: 33-39.

謝辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なるご指導を賜りました麻布大学獣医分子生物学研究室 村上賢教授、日本どうぶつ先進医療研究所株式会社 上地正実氏に深甚なる謝意を表します。また貴重な御助言および御校閲を賜りました同獣医生理学第二研究室 折戸謙介教授、および同獣医小動物外科学研究室 青木卓磨准教授に深謝致します。

本研究を進めるにあたりご指導いただきましたカリフォルニア大学デービス校 Mark D Kittleson 先生に深謝致します。

本研究を行う上でご協力および御助言いただきました同獣医分子生物学研究室 迫田翔太郎氏、林滉平氏に深謝いたします。

日々、多忙な研究室活動の中、終始甚大なるご協力を惜しまれなかった同獣医分子生物学研究室の客員の皆様に深謝いたします。

社会人大学院生として本研究を行うにあたり、多大なご協力を頂いた JASMINE どうぶつ循環器病センター スタッフの皆様に深謝いたします。

最後に、本研究のために尊い命を捧げてくれた動物たちに心から感謝するとともに冥福を祈ります。

引用文献

- ADIMOOLAM, S. & FORD, J. M. 2002. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12985-90.
- AFFATATO, A., VILLAGRA, F., DE LEON, J. P., GOMEZ, R., CHECA, S. L., VELLIBRE, D., SANCHEZ, P., DIEZ BALDA, J. I. & BRITO, J. M. 1988. Phrenic nerve paralysis following pediatric cardiac surgery. Role of diaphragmatic plication. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 29, 606-9.
- AMIN, Z., MCELHINNEY, D. B., STRAWN, J. K., KUGLER, J. D., DUNCAN, K. F., REDDY, V. M., PETROSSIAN, E. & HANLEY, F. L. 2001. Hemidiaphragmatic paralysis increases postoperative morbidity after a modified Fontan operation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 122, 856-62.
- ARNDT, J. W., REYNOLDS, C. A., SINGLETARY, G. E., CONNOLLY, J. M., LEVY, R. J. & OYAMA, M. A. 2009. Serum serotonin concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med*, 23, 1208-13.
- BANDLA, H. P., HOPKINS, R. L., BECKERMAN, R. C. & GOZAL, D. 1999. Pulmonary risk factors compromising postoperative recovery after surgical repair for congenital heart disease. *Chest*, 116, 740-7.
- BARAKA, A., KAWKABANI, N., DABBOUS, A. & NAWFAL, M. 2000. Lidocaine for prevention of reperfusion ventricular fibrillation after release of aortic cross-clamping. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 14, 531-3.
- BIRKEGARD, A. C., REIMANN, M. J., MARTINUSSEN, T., HAGGSTROM, J.,

- PEDERSEN, H. D. & OLSEN, L. H. 2016. Breeding Restrictions Decrease the Prevalence of Myxomatous Mitral Valve Disease in Cavalier King Charles Spaniels over an 8- to 10-Year Period. *J Vet Intern Med*, 30, 63-8.
- CHENG, D. C., MARTIN, J., LAL, A., DIEGELER, A., FOLLIGUET, T. A., NIFONG, L. W., PERIER, P., RAANANI, E., SMITH, J. M., SEEBURGER, J. & FALK, V. 2011. Minimally invasive versus conventional open mitral valve surgery: a meta-analysis and systematic review. *Innovations (Phila)*, 6, 84-103.
- CHRISTAKIS, G. T., KORMOS, R. L., WEISEL, R. D., FREMES, S. E., TONG, C. P., HERST, J. A., SCHWARTZ, L., MICKLEBOROUGH, L. L., SCULLY, H. E. & GOLDMAN, B. S. 1985. Morbidity and mortality in mitral valve surgery. *Circulation*, 72, 1120-8.
- CREMER, S. E., MOESGAARD, S. G., RASMUSSEN, C. E., ZOIS, N. E., FALK, T., REIMANN, M. J., CIRERA, S., AUPPERLE, H., OYAMA, M. A. & OLSEN, L. H. 2015. Alpha-smooth muscle actin and serotonin receptors 2A and 2B in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Res Vet Sci*, 100, 197-206.
- CREMER, S. E., SINGLETARY, G. E., OLSEN, L. H., WALLACE, K., HAGGSTROM, J., LJUNGVALL, I., HOGLUND, K., REYNOLDS, C. A., PIZZINAT, N. & OYAMA, M. A. 2014. Serotonin concentrations in platelets, plasma, mitral valve leaflet, and left ventricular myocardial tissue in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med*, 28, 1534-40.
- DARMON, M., AL AWABDH, S., EMERIT, M. B. & MASSON, J. 2015. Insights into Serotonin Receptor Trafficking: Cell Membrane Targeting and Internalization. *Prog*

Mol Biol Transl Sci, 132, 97-126.

- DE LEEUW, M., WILLIAMS, J. M., FREEDOM, R. M., WILLIAMS, W. G., SHEMIE, S. D. & MCCRINDLE, B. W. 1999. Impact of diaphragmatic paralysis after cardiothoracic surgery in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118, 510-7.
- DEVEREUX, R. B., ALONSO, D. R., LUTAS, E. M., GOTTLIEB, G. J., CAMPO, E., SACHS, I. & REICHEK, N. 1986. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*, 57, 450-8.
- DIMOPOULOU, I., DAGANOU, M., DAFNI, U., KARAKATSANI, A., KHOURY, M., GEROULANOS, S. & JORDANOGLU, J. 1998. Phrenic nerve dysfunction after cardiac operations: electrophysiologic evaluation of risk factors. *Chest*, 113, 8-14.
- DOHERTY, P. W., MCLAUGHLIN, P. R., BILLINGHAM, M., KERNOFF, R., GORIS, M. L. & HARRISON, D. C. 1979. Cardiac damage produced by direct current countershock applied to the heart. *Am J Cardiol*, 43, 225-32.
- DUPRE, G. & HEIDENREICH, D. 2016. Brachycephalic Syndrome. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 46, 691-707.
- DURST, R., SAULS, K., PEAL, D. S., DEVLAMING, A., TOOMER, K., LEYNE, M., SALANI, M., TALKOWSKI, M. E., BRAND, H., PERROCHEAU, M., SIMPSON, C., JETT, C., STONE, M. R., CHARLES, F., CHIANG, C., LYNCH, S. N., BOUATIA-NAJI, N., DELLING, F. N., FREED, L. A., TRIBOUILLOY, C., LE TOURNEAU, T., LEMAREC, H., FERNANDEZ-FRIERA, L., SOLIS, J., TRUJILLANO, D., OSSOWSKI, S., ESTIVILL, X., DINA, C., BRUNEVAL, P., CHESTER, A., SCHOTT, J. J., IRVINE, K. D., MAO, Y., WESSELS, A.,

- MOTIWALA, T., PUCEAT, M., TSUKASAKI, Y., MENICK, D. R., KASIGANESAN, H., NIE, X., BROOME, A. M., WILLIAMS, K., JOHNSON, A., MARKWALD, R. R., JEUNEMAITRE, X., HAGEGE, A., LEVINE, R. A., MILAN, D. J., NORRIS, R. A. & SLAUGENHAUPT, S. A. 2015. Mutations in DCHS1 cause mitral valve prolapse. *Nature*, 525, 109-13.
- EMMERSON, T. 2014. Brachycephalic obstructive airway syndrome: a growing problem. *J Small Anim Pract*, 55, 543-4.
- ENRIQUEZ-SARANO, M., AKINS, C. W. & VAHANIAN, A. 2009. Mitral regurgitation. *Lancet*, 373, 1382-94.
- FIGLIORE, A. C., NAUNHEIM, K. S., TAUB, J., BRAUN, P., MCBRIDE, L. R., PENNINGTON, D. G., KAISER, G. C., WILLMAN, V. L. & BARNER, H. B. 1990. Myocardial preservation using lidocaine blood cardioplegia. *Ann Thorac Surg*, 50, 771-5.
- FOX, P. R. 2012. Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. *J Vet Cardiol*, 14, 103-26.
- FOX, P. R., SISSON, D. & MOÏSE, N. S. 1999. *Textbook of canine and feline cardiology : principles and clinical practice*, Philadelphia, Saunders.
- FRENCH, A. T., OGDEN, R., ELAND, C., HEMANI, G., PONG-WONG, R., CORCORAN, B. & SUMMERS, K. M. 2012. Genome-wide analysis of mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *Vet J*, 193, 283-6.
- FUJIMURA, N., NAMBA, H., TSUNODA, K., KAWAMATA, T., TAKI, K., IGARASI, M. & NAMIKI, A. 1995. Effect of hemidiaphragmatic paresis caused by interscalene

brachial plexus block on breathing pattern, chest wall mechanics, and arterial blood gases. *Anesth Analg*, 81, 962-6.

GAISSERT, H. & WILCOX, S. R. 2016. Diaphragmatic Dysfunction after Thoracic Operations. *Thorac Cardiovasc Surg*, 64, 621-630.

GERSCOVICH, E. O., CRONAN, M., MCGAHAN, J. P., JAIN, K., JONES, C. D. & MCDONALD, C. 2001. Ultrasonographic evaluation of diaphragmatic motion. *J Ultrasound Med*, 20, 597-604.

GUSTAFSSON, B. I., TOMMERAS, K., NORDRUM, I., LOENNECHEN, J. P., BRUNSVIK, A., SOLLIGARD, E., FOSSMARK, R., BAKKE, I., SYVERSEN, U. & WALDUM, H. 2005. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation*, 111, 1517-22.

HAGGSTROM, J., BOSWOOD, A., O'GRADY, M., JONS, O., SMITH, S., SWIFT, S., BORGARELLI, M., GAVAGHAN, B., KRESKEN, J. G., PATTESON, M., ABLAD, B., BUSSADORI, C. M., GLAUS, T., KOVACEVIC, A., RAPP, M., SANTILLI, R. A., TIDHOLM, A., ERIKSSON, A., BELANGER, M. C., DEINERT, M., LITTLE, C. J., KVART, C., FRENCH, A., RONN-LANDBO, M., WESS, G., EGGERTSDOTTIR, A. V., O'SULLIVAN, M. L., SCHNEIDER, M., LOMBARD, C. W., DUKES-MCEWAN, J., WILLIS, R., LOUVET, A. & DIFRUSCIA, R. 2008. 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*, 22, 1124-35.

HALL, J. E. & EBOOKS CORPORATION 2013. *Guyton and Hall textbook of medical*

physiology. 13th edition. ed.

- HALLER, J. A., JR., PICKARD, L. R., TEPAS, J. J., ROGERS, M. C., ROBOTHAM, J. L., SHORTER, N. & SHERMETA, D. W. 1979. Management of diaphragmatic paralysis in infants with special emphasis on selection of patients for operative plication. *J Pediatr Surg*, 14, 779-85.
- HOAREAU, G. L., JOURDAN, G., MELLEMA, M. & VERWAERDE, P. 2012. Evaluation of arterial blood gases and arterial blood pressures in brachycephalic dogs. *J Vet Intern Med*, 26, 897-904.
- JOHO-ARREOLA, A. L., BAUERSFELD, U., STAUFFER, U. G., BAENZIGER, O. & BERNET, V. 2005. Incidence and treatment of diaphragmatic paralysis after cardiac surgery in children. *Eur J Cardiothorac Surg*, 27, 53-7.
- KEENE, B. W., ATKINS, C. E., BONAGURA, J. D., FOX, P. R., HAGGSTROM, J., FUENTES, V. L., OYAMA, M. A., RUSH, J. E., STEPIEN, R. & UECHI, M. 2019. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med*, 33, 1127-1140.
- LAGHI, F. & TOBIN, M. J. 2003. Disorders of the respiratory muscles. *Am J Respir Crit Care Med*, 168, 10-48.
- LEE, C. M., HAN, J. I., KANG, M. H., KIM, S. G. & PARK, H. M. 2018. Polymorphism in the serotonin transporter protein gene in Maltese dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Sci*, 19, 129-135.
- LEE, J., MIZUNO, M., MIZUNO, T., HARADA, K. & UECHI, M. 2015. Pathologic Manifestations on Surgical Biopsy and Their Correlation with Clinical Indices in

- Dogs with Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Intern Med*, 29, 1313-21.
- LEGERSKI, R. & PETERSON, C. 1992. Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature*, 359, 70-3.
- LEMMER, J., STILLER, B., HEISE, G., HUBLER, M., ALEXI-MESKISHVILI, V., WENG, Y., REDLIN, M., AMANN, V., OVROUTSKI, S. & BERGER, F. 2006. Postoperative phrenic nerve palsy: early clinical implications and management. *Intensive Care Med*, 32, 1227-33.
- LEVY, F. O., QVIGSTAD, E., KROBERT, K. A., SKOMEDAL, T. & OSNES, J. B. 2008. Effects of serotonin in failing cardiac ventricle: signalling mechanisms and potential therapeutic implications. *Neuropharmacology*, 55, 1066-71.
- LI, L., PETERSON, C. & LEGERSKI, R. 1996. Sequence of the mouse XPC cDNA and genomic structure of the human XPC gene. *Nucleic Acids Res*, 24, 1026-8.
- MANNING, A. S. & HEARSE, D. J. 1984. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*, 16, 497-518.
- MARKBY, G. R., SUMMERS, K. M., MACRAE, V. E. & CORCORAN, B. M. 2017. Comparative Transcriptomic Profiling and Gene Expression for Myxomatous Mitral Valve Disease in the Dog and Human. *Vet Sci*, 4.
- MAUERMAN, W. J., PULIDO, J. N., BARBARA, D. W., ABEL, M. D., LI, Z., MEADE, L. A., SCHAFF, H. V. & WHITE, R. D. 2012. Amiodarone versus lidocaine and placebo for the prevention of ventricular fibrillation after aortic crossclamping: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 144, 1229-34.

- MEURS, K. M., FRIEDENBERG, S. G., WILLIAMS, B., KEENE, B. W., ATKINS, C. E., ADIN, D., AONA, B., DEFRANCESCO, T., TOU, S. & MACKAY, T. 2018. Evaluation of genes associated with human myxomatous mitral valve disease in dogs with familial myxomatous mitral valve degeneration. *Vet J*, 232, 16-19.
- MITA, N., KAGAYA, S., MIYOSHI, S. & KURODA, M. 2019. Prophylactic Effect of Amiodarone Infusion on Reperfusion Ventricular Fibrillation After Release of Aortic Cross-Clamp in Patients with Left Ventricular Hypertrophy Undergoing Aortic Valve Replacement: A Randomized Controlled Trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 33, 1205-1213.
- MIZUNO, T., MIZUKOSHI, T. & UECHI, M. 2013. Long-term outcome in dogs undergoing mitral valve repair with suture annuloplasty and chordae tendinae replacement. *J Small Anim Pract*, 54, 104-7.
- MOK, Q., ROSS-RUSSELL, R., MULVEY, D., GREEN, M. & SHINEBOURNE, E. A. 1991. Phrenic nerve injury in infants and children undergoing cardiac surgery. *Br Heart J*, 65, 287-92.
- NASON, L. K., WALKER, C. M., MCNEELEY, M. F., BURIVONG, W., FLIGNER, C. L. & GODWIN, J. D. 2012. Imaging of the diaphragm: anatomy and function. *Radiographics*, 32, E51-70.
- PACKER, R. M. & TIVERS, M. S. 2015. Strategies for the management and prevention of conformation-related respiratory disorders in brachycephalic dogs. *Vet Med (Auckl)*, 6, 219-232.
- REISMAN, A. M., THOMAS, A. T., BOATENG, P. & LEITMAN, I. M. 2019. Predictors of

- 30-day outcomes following mitral valve repair. *Ann Med Surg (Lond)*, 47, 5-12.
- RICOY, J., RODRIGUEZ-NUNEZ, N., ALVAREZ-DOBANO, J. M., TOUBES, M. E., RIVEIRO, V. & VALDES, L. 2018. Diaphragmatic dysfunction. *Pulmonology*.
- ROBERTSON, J. M., VINTEN-JOHANSEN, J., BUCKBERG, G. D., ROSENKRANZ, E. R. & MALONEY, J. V., JR. 1984. Safety of prolonged aortic clamping with blood cardioplegia. I. Glutamate enrichment in normal hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 88, 395-401.
- ROSENKRANZ, E. R., OKAMOTO, F., BUCKBERG, G. D., VINTEN-JOHANSEN, J., ALLEN, B. S., LEAF, J., BUGYI, H., YOUNG, H. & BARNARD, R. J. 1986. Biochemical studies: failure of tissue adenosine triphosphate levels to predict recovery of contractile function after controlled reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 92, 488-501.
- STERN, J. A., HSUE, W., SONG, K. H., ONTIVEROS, E. S., LUIS FUENTES, V. & STEPIEN, R. L. 2015. Severity of Mitral Valve Degeneration Is Associated with Chromosome 15 Loci in Whippet Dogs. *PLoS One*, 10, e0141234.
- SUGASAWA, K., NG, J. M., MASUTANI, C., IWAI, S., VAN DER SPEK, P. J., EKER, A. P., HANAOKA, F., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. 1998. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, 2, 223-32.
- THOURANI, V. H., WEINTRAUB, W. S., GUYTON, R. A., JONES, E. L., WILLIAMS, W. H., ELKABBANI, S. & CRAVER, J. M. 2003. Outcomes and long-term survival for patients undergoing mitral valve repair versus replacement: effect of age and

- concomitant coronary artery bypass grafting. *Circulation*, 108, 298-304.
- UECHI, M. 2012. Mitral valve repair in dogs. *J Vet Cardiol*, 14, 185-92.
- UECHI, M., MIZUKOSHI, T., MIZUNO, T., MIZUNO, M., HARADA, K., EBISAWA, T., TAKEUCHI, J., SAWADA, T., UCHIDA, S., SHINODA, A., KASUYA, A., ENDO, M., NISHIDA, M., KONO, S., FUJIWARA, M. & NAKAMURA, T. 2012. Mitral valve repair under cardiopulmonary bypass in small-breed dogs: 48 cases (2006-2009). *J Am Vet Med Assoc*, 240, 1194-201.
- VAN DEN BERG, L., KWANT, L., HESTAND, M. S., VAN OOST, B. A. & LEEGWATER, P. A. 2005. Structure and variation of three canine genes involved in serotonin binding and transport: the serotonin receptor 1A gene (*htr1A*), serotonin receptor 2A gene (*htr2A*), and serotonin transporter gene (*slc6A4*). *J Hered*, 96, 786-96.
- VAN ONNA, I. E., METZ, R., JEKEL, L., WOOLLEY, S. R. & VAN DE WAL, H. J. 1998. Post cardiac surgery phrenic nerve palsy: value of plication and potential for recovery. *Eur J Cardiothorac Surg*, 14, 179-84.
- WANG, G., DOMBKOWSKI, A., CHUANG, L. & XU, X. X. 2004. The involvement of XPC protein in the cisplatin DNA damaging treatment-mediated cellular response. *Cell Res*, 14, 303-14.
- Wit, A., and Janse, M. J. (eds): *The Ventricular Arrhythmias of Ischemia and Infarction: Electrophysiological Mechanisms*. Mt. Kisco, N. Y., Futura, 1993.
- YAMAGUCHI, H., WEIL, M., TANG, W., KAMOHARA, T., JIN, X. & BISERA, J. 2002. Myocardial dysfunction after electrical defibrillation. *Resuscitation*, 54, 289-96.
- YIGIN, A. K., VATAN, M. B., AKDEMIR, R., AKSOY, M. N., CAKAR, M. A., KILIC, H.,

ERKORKMAZ, U., KARACAN, K. & KALELI, S. 2015. DNA Repair Gene Polymorphism and the Risk of Mitral Chordae Tendineae Rupture. *Dis Markers*, 2015, 825020.

表 1 心室細動あり群と心室細動なし群の術前因子、術中因子の比較

後日公開

表 2 大動脈遮断解除後に発生する心室細動のリスク因子の比較

後日公開

表 3 晶質液カルディオプレジア群と血液カルディオプレジア群の術前因子・術中
因子の比較

後日公開

表 4 晶質液カルディオプレジア群と血液カルディオプレジアの術前-術後 1 ヶ月
における心臓サイズ、心収縮力の変化の比較

後日公開

表 5 横隔神経麻痺あり群と横隔神経麻痺なし群の術前因子・術中因子の比較

	UDP 群 n = 86	Non-UDP 群 n = 198	P 値
年齢 (月)	125.5 (58–168)	122.0 (59–176)	p = 0.250
体重 (kg)	3.3 (1.6–10.2)	3.8 (1.7–13.5)	p = 0.223
VHS	11.9 (9.6–15.2)	12.0(8.8–15.6)	p = 0.532
LA/Ao	2.14 (1.37–3.26)	2.27 (1.20–4.44)	p = 0.146
LVIDDN	2.10 (1.13–3.14)	2.20 (1.07–3.22)	p = 0.010
大動脈遮断時間 (分)	55 (32–118)	56 (34–148)	p = 0.785
総麻酔時間 (分)	345 (238–1197)	331 (164–1036)	p = 0.405

数値は中央値（最小–最大）で表記

VHS：胸骨心臓サイズ、LA/Ao：左心房・大動脈径比、LVIDDN：体重標準化左心室
拡張末期径

表 6 横隔神経麻痺と術後の死亡、呼吸不全による死亡、集中治療・入院期間との関連

	オッズ比	95%信頼区間	P 値
術後の死亡	2.2	0.9 – 5.5	p = 0.08
呼吸不全による死亡	10.5	1.4 – 81.0	p = 0.024
集中治療期間	1.07	0.88 – 1.23	p = 0.500
入院期間	0.95	0.83 – 1.08	p = 0.420

表 7 呼吸不全で死亡した症例の一覧

症例	犬種	横隔神経麻痺の有無	呼吸器疾患	手術時の肺水腫	死亡までの日数（日）
1	シー・ズー	あり	なし	なし	12
2	チワワ	あり	なし	なし	3
3	トイ・プードル	あり	なし	あり	3
4	チワワ	あり	上気道閉塞 気管虚脱 grade 4	なし	2
5	雑種	あり	なし	あり	2
6	ポメラニアン	あり	気管虚脱 grade 4	なし	9
7	チワワ	あり	咽頭気道閉塞	なし	3
8	チワワ	あり	咽頭気道閉塞 気管虚脱 grade 3	なし	3
9	マルチーズ	なし	肺ブラ	なし	2

表 8 チワワの原因候補遺伝子の探索に使用したプライマー

Gene	Exon	5' - primer	3' - primer	アニーリング温度(°C)	伸長時間(秒)
SERT	1	TGCGTAACTCTGTTCTCC	AGACATGATCACTGCTCTGG	60	30
SERT	2	GTGAGGTCATTCAACACAGG	CTGATTCCAGAAGAAGGTCC	60	30
SERT	3	TTACCACATTGCCACCTGCC	AGAGTGGGGTCCAGGAAGAA	62	45
SERT	4	AAGGAGATGCCTGAAAGTCCG	TCACACAATGGTTCTTGGGATTG	62	30
SERT	5-6	GGGCCATGATCAGTGCGTTA	CAAATGGAATTGGCCTGGGG	62	60
SERT	7	CCAACCAGTCTGAGAGGCAG	GGACTCATTGCCAGACCCAA	62	30
SERT	8	TCATTGTTGGTGTGGCTGAG	TCAAGAGCACCACAGTGAGG	60	30
SERT	9	CTACTCATGACCAGCAAC	CCAGATACTCTGTCAAGC	55	30
SERT	10	AGTGCTCCATAGGACAGG	TTGTGGTAGAGCGTGAAG	60	30
SERT	11	CGTCTCAACTTCAGAGCAG	GATGTGACACATGCAGCAG	60	30
SERT	12	GCCCTGAAGGGGTTGCTTTA	TGCCACTGCATCTAAGGCTC	62	45
SERT	13	AATTGGGAATTCCTTTCATGAGG	AGGCCATATTTGCCTGTGGA	62	60
XPC	16	ATAAACATCTTTGCATTTGGCAGC	CTTCTGTGCTTTCTTAGAGGAGAT	60	30
DCHS1	19	TGATAATCGTCCCACCATCC	AGGTGGTAGGAAATGTGACC	60	60
DCHS1	21	TCAGACTTCCAAGGCCATTT	CTAAGGGTGAAACGCACAAG	60	60

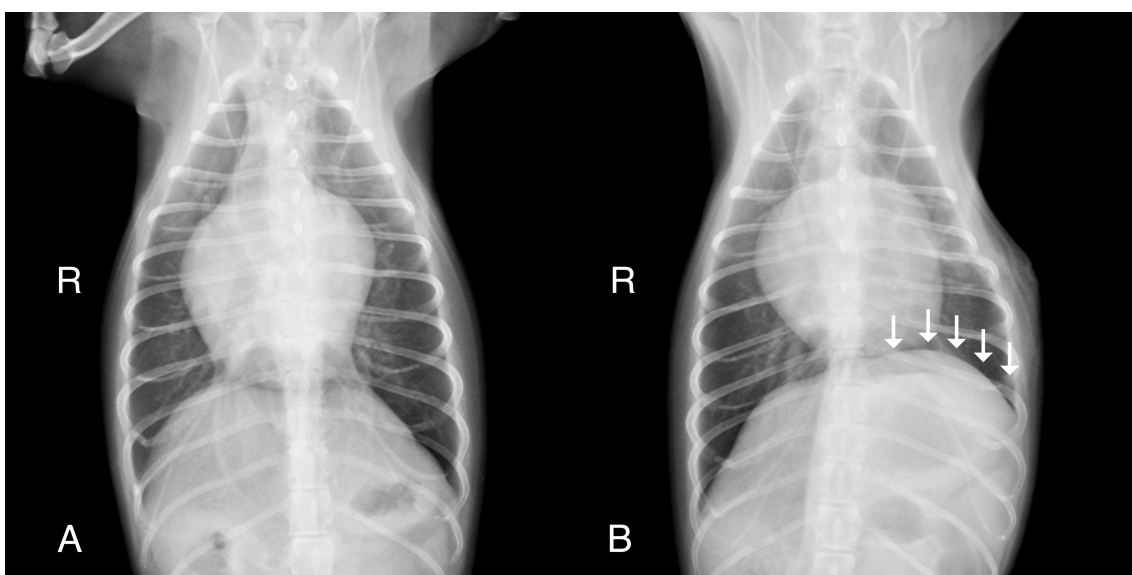


図 1 横隔神経麻痺の診断

僧帽弁修復術実施前 (A) および術後 1 日目の胸部 X 線吸気時背腹像 (B) を示す。僧帽弁修復術実施前と比較し、横隔膜左脚 (矢印) が 1 肋間以上挙上したものを横隔神経麻痺と診断した。