

心不全犬に対する心不全治療薬としての  
交感神経遮断薬の使用法に関する検討

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻  
博士課程

中村 隆

2013

略語

AC5 ; Adenylyl cyclase type 5	アデニル酸シクラーゼ 5 型
AC5KO ; Mice with type 5 adenylyl cyclase knockout	アデニル酸シクラーゼ 5 型ノックアウトマウス
ANOVA ; Analysis of variance	分散分析
AoVTI ; Time-velocity integral of aortic flow	大動脈流速時間積分値
FS ; Fractional shortening	左室内径短縮率
GFR ; Glomerular filtration rate	糸球体濾過量
LA/Ao ; Ratio of left atrium to aortic root diameter	左房・大動脈径比
LVIDd ; Left ventricular internal diameter at diastole	左室拡張末期内径
LVIDs ; Left ventricular internal diameter at systole	左室収縮末期内径
SV ; Stroke volume	1 回拍出量

## 目次

	頁
序文	1
第1章 健康犬への内因性および外因性交感神経刺激に対する低用量および高用量カルベジロールの交感神経抑制作用の検討	6
1. 緒言	7
2. 材料および方法	9
3. 結果	14
4. 考察	25
5. 小活	30
第2章 心不全犬に対する短期的カルベジロール投薬が心拍数および運動耐性に及ぼす影響	31
1. 緒言	32
2. 材料および方法	34
3. 結果	39
4. 考察	45
5. 小活	48

第3章 心不全犬に対する心臓型アデニル酸シクラーゼ5型阻害薬の心血行動態に及ぼす影響	49
1. 緒言	50
2. 材料および方法	53
3. 結果	59
4. 考察	70
5. 小活	75
総括	76
謝辞	81
引用文献	82

## 序文

心臓に向かう交感神経線維は脊髄の第 1 から第 5 胸椎より分岐し、傍脊椎神経節内でシナプス形成後、洞房結節や房室結節のみならず、心臓全体に分布する [Lymeropoulos et al 2013, Triposkiadis et al 2009]。心臓における交感神経の活性化は循環血液中のカテコラミン濃度の増加および交感神経終末からのノルアドレナリンの放出増加により生じる [Long and Kirby 2008]。ノルアドレナリンは主に心筋の  $\beta_1$  受容体に結合し、共役している Gs 蛋白質を刺激する。刺激された Gs 蛋白質はアデニル酸シクラーゼの活性化を介した細胞内 cAMP の増加を引き起こし、プロテインキナーゼ A を活性化する [Ishikawa and Homcy 1997]。活性化されたプロテインキナーゼ A はトロポニン、ホスホランバンおよびカルスタビンなどの様々なカルシウムハンドリング蛋白質をリン酸化することにより、最終的に心拍数や心筋収縮力、心拍出量の増加を引き起こす [Bers 2002, Fujita and Ishikawa 2011, Yano et al 2005]。

心不全時にはレニンアンギオテンシンアルドステロン系や交感神経系、バソプレシン、エンドセリンなどの様々な神経体液性因子が活性化し、病態に関与している [Sisson 2004]。中でも心不全時の心拍出量および血圧の低下による末梢循環不全に対する代償機序として病期の比較的早期より交感神経の活性化が生じていることが知られている [Bristow 2000, Fujii and Wakao 2003, Leimbach et al 1986]。心不全時の循環不全に伴う交感神経の活性化は、初期には心拍出量や血圧の上昇により末梢臓器への循環血液量を維持するため、心不全を代償する働きをなす。しかしながら、慢性的な交感神経の活性化はカテコラミンによる心筋毒性、頻拍に伴う拡張傷害や心筋虚血などにより、左室収縮力の低下や心筋肥大、組織障害 (心筋間質線維化や心筋細胞死)、心筋酸素消費量の増加、不

整脈の誘発などを引き起こすため、末梢循環血液量を減少させる。そのため、慢性的な交感神経の活性化は心不全による病態の悪化を助長する [El-Armouche and Eschenhagen 2008, Iwase et al 1996a]。さらに、慢性的な交感神経の活性化は慢性心不全患者の予後を悪化させることが報告されていることから [Cohn et al 1984, Floras 2009, Kaye et al 1995]、 $\beta$  遮断薬などの交感神経遮断薬を用いた治療法は心不全治療における予後の改善の目的において重要な要因となると考えられている [CIBIS-II Investigators and Committees 1999, Gilbert et al 1996, MERIT-HF Study Group 1999, Packer et al 1996, Packer et al 2001]。

$\beta$  遮断薬は心臓における交感神経を抑制する代表的な薬剤である [McTavish et al 1993]。 $\beta$  遮断薬は作用する  $\beta$  受容体のサブタイプや血管拡張作用の有無などにより作用に差異が存在するが、交感神経抑制作用による陰性変時・変力作用を引き起こす薬剤であるという点において共通している [Adamson and Gilbert 2006, Bristow 2000]。心不全治療において用いられる代表的な  $\beta$  遮断薬は  $\beta_1$  受容体に対して選択性を示すメトプロロールとビソプロロール、および  $\beta$  受容体に対して非選択性を示すカルベジロールである [Triposkiadis et al 2009]。心不全患者における  $\beta$  遮断薬の投薬はカテコラミンによる心臓毒性の抑制や陰性変時・変力作用に伴う拡張能の改善、心筋酸素消費量の低下、 $\beta$  受容体のアップレギュレーション、血管収縮因子や炎症性サイトカインの抑制、心筋細胞内カルシウムハンドリング蛋白質の発現正常化などの様々な有益な作用を引き起こすことが現在までに報告されている [Adamson and Gilbert 2006, Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006]。中でも、カルベジロールは他の  $\beta$  遮断薬と異なり、

抗酸化作用や  $\alpha$  遮断作用による血管拡張作用等を有しており、多様な作用にて心機能保護作用を示すことから、他の  $\beta$  遮断薬に比較して心保護効果が強いことが予想される [Chua et al 2008, Cimmino et al 2011, Dandona et al 2000, Kukin et al 1999, Le et al 2013, Mochizuki et al 2007, Sun et al 2005, Zhou et al 2011, Zhuang et al 2009]。

獣医臨床領域における心疾患動物に対する  $\beta$  遮断薬の報告は限られており、投薬に関する明確なガイドラインは存在しない [Atkins et al 2009]。Rush らは自然発生性の粘液腫様僧帽弁疾患の犬に対するメトプロロールの影響を報告しているが、コントロール群を伴っておらず、メトプロロールの安全性に言及するのみであり有効性を確認するに至っていない [Rush et al 2002]。また、心疾患犬に対するカルベジロール治療に関していくつか報告されているものの、自然発生性の心疾患犬に対するカルベジロール治療の血行動態改善効果に関して一定した見解は得られなかった [Gordon et al 2012, Marcondes-Santos et al 2007, Oyama et al 2007]。さらに、カルベジロールの臨床報告で用いられている維持薬用量は 0.3 mg/kg および 1.1 mg/kg であるが、これらの臨床報告にて用いられている維持薬用量における薬用量間の差異がどの程度交感神経抑制作用の違いを生じるのかはわかっていない。そのため、獣医臨床領域において心疾患犬に対するカルベジロールの最適な薬用量および使用方法が確立されていないのが現状である。

また、人医領域においてカルベジロールによる交感神経抑制作用は心不全患者の副作用を増加させ、本薬剤に耐用できない患者が存在することが問題となっている [Bristow 2000, Ko et al 2002]。近年、心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型



阻害作用を有するビダラビンは心不全マウスの生存率改善作用および心臓組織保護作用を有することが発見された [Iwatsubo et al 2012]。また、本薬剤は心機能低下作用が弱いことが *in vitro* にて報告されており [Iwatsubo et al 2004]、カルベジロールに比較して耐用性が高い薬剤であることが期待されている。しかしながら、本薬剤の大型動物に対する心行動態や心臓組織に及ぼす影響は不明であり、臨床応用に至っていない。

本研究の目的は、健常犬および心不全犬におけるカルベジロールの臨床維持薬用量における交感神経抑制作用を評価するとともに、心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型を標的とした新規交感神経遮断薬であるビダラビンの心不全犬に対する有効性を検討することである。

## 第1章

健常犬への内因性および外因性交感神経刺激に対する  
低用量および高用量カルベジロールの交感神経抑制作用の検討

## 1. 緒言

カルベジロールは非選択的  $\beta$  遮断作用を有すると共に、 $\alpha_1$  遮断作用による血管拡張作用および抗酸化作用などの多様な作用を有する  $\beta$  遮断薬である [McTavish et al 1993]。心不全患者に対するカルベジロールの有効な作用として、心拍数の低下作用 [McAlister et al 2009, Packer 2003]や心臓の構造ならびに機能の改善作用、腎機能の維持作用等が報告されている [Bakris et al 2006, Kukin et al 1999, Watanabe et al 2000, Zhou et al 2011]。特に心拍数の減少は心不全患者における死亡リスクを減少させると共に心筋収縮力を改善することが人医領域において報告されている [Cullington et al 2012, Flannery et al 2008, Fox et al 2008, McAlister et al 2009, Thackray et al 2006]。また、犬においても陰性変時・変力作用は心筋酸素消費量の低下や左室機能の改善に寄与することが報告されている [Colin et al 2003, Coin et al 2004, Guth et al 1987, Nagatsu et al 2000]。さらに、カルベジロールは実験的に作出された心不全犬において他の  $\beta$  遮断薬に比較して心血行動態の改善作用や抗炎症作用が強いことが報告されており [Le et al 2013, Nikolaidis et al 2006]、獣医臨床領域においてもカルベジロールは心不全治療薬としての有効性が期待されている。

拡張型心筋症および粘液腫様僧帽弁疾患の犬にカルベジロール治療を行った獣医臨床研究が過去に報告されている [Gordon et al 2012, Marcondes-Santos et al 2007, Oyama et al 2007]。これらの臨床報告にて用いられているカルベジロールの維持薬用量は 0.3 mg/kg および 1.1 mg/kg である。しかしながら、Oyama らは 0.3 mg/kg の薬用量は拡張型心筋症の犬に対して適切な交感神経抑制作用を示さ

なかった可能性を示唆している [Oyama et al 2007]。また、カルベジロールは血中濃度の半減期が短い (90 分) ことから 1 日に複数回の投薬が必要であることが健常犬に対する薬物動態の研究より示唆されている [Arsenault et al 2005, Gordon et al 2012]。しかしながら、Uechi らは低用量 (0.2 および 0.4 mg/kg) のカルベジロールを健常犬に対して 1 日 1 回投薬することによってイソプロテレノールによる交感神経活性を 24 時間以上抑制することを明らかにしている [Uechi et al 2002]。これらの報告間におけるカルベジロールの効果に関する相違の理由としては内因性および外因性交感神経活性間においてカルベジロールが異なる薬物力学を示す可能性が考えられる。

本研究の目的は、健常ビーグル犬への内因性および外因性交感神経刺激に対する低用量および高用量カルベジロールの交感神経抑制作用を評価することである。

## 2. 材料および方法

本研究は日本大学生物資源科学部動物実験委員会の承認を得て、実験指針に基づき行われた。

### 1) 供試動物

日本大学生物資源科学部附属第3実験動物研究センターにて飼養されており、身体検査ならびに血圧測定、胸部 X 線検査、心臓超音波検査にて心臓の構造および機能に異常を認めない健常ビーグル犬9頭 (雄4頭、雌5頭、体重8-12 kg、年齢1-7歳齢)を本試験に用いた。イソプロテレノール刺激試験および運動負荷試験をそれぞれ7頭に行った。また、運動負荷試験を行った7頭中4頭にて血中カルベジロール濃度を測定した。各犬を1頭ずつ個別ケージにて飼育した。実験前から実験終了までの間、市販のドライフードを1日2回給餌し、水は自由飲水とした。各犬を実験環境に順応させるため、実験開始前に実験室およびハンドリングへの順応処理を行った。また、運動負荷試験開始1週間前より、各犬はトレッドミルにて走行練習を行った。

### 2) カルベジロールの投薬

カルベジロール (アーチスト<sup>®</sup>、第一製薬株式会社、東京)の薬用量は、過去の臨床試験の薬用量に基づき、低用量として0.4 mg/kg、高用量として1.0 mg/kgと設定し [Gordon et al 2012, Marcondes-Santos et al 2007, Oyama et al 2007]、1日1回 (午前8時)、経口投与にて7日間投薬した。また、無投薬において各負荷試

験を行った結果をコントロールとした。なお、本実験はクロスオーバー試験に行った。各薬用量間の実験は最低でも1週間の休薬の後に行った。

### 3) イソプロテレノール刺激試験

外因性交感神経刺激としてイソプロテレノール負荷試験を行った。イソプロテレノール刺激試験はカルベジロール投薬開始1日目 (Day 1)および7日目 (Day 7)に行った。また、Uechiらの過去の報告により、カルベジロールは投薬後3時間にて健常犬に対して交感神経抑制作用を認めることが報告されていることから、本研究においてもカルベジロール投薬後3時間よりイソプロテレノール刺激試験を開始した [Uechi et al 2002]。なお、全ての犬に対して実験開始20分前にブトルファノール (0.1 mg/kg)(ベトルファール<sup>®</sup>、明治製菓株式会社、東京)の静脈内投与にて鎮静を行った。イソプロテレノール (プロタノール-L<sup>®</sup>、興和創薬株式会社、東京)を橈側皮静脈に挿入した留置針 (サーフローF&F<sup>®</sup> 22G、テルモ株式会社、東京)よりシリンジポンプ (テルフュージョンシリンジポンプ TE-331S、テルモ株式会社、東京)を用いて投与を行い、低用量より10分毎に用量を漸増した (0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 および0.10 µg/kg/min)。イソプロテレノールの各用量時において血行動態が安定した時点にて心拍数、観血的動脈血圧の測定および心臓超音波検査を行った。心拍数の測定には携帯型心電計 (リード・マイハート<sup>®</sup>、デイリーケアバイオメディカル株式会社、中壢、台湾)を用い、30秒毎に連続的に計測した。動脈血圧は足背動脈に24Gの留置針 (サーフローF&F<sup>®</sup> 24G、テルモ株式会社、東京)を設置した後、生理食塩水 (大塚生食注<sup>®</sup>、大塚製薬株式会社、東京)にて充填されたトランスデューサー (DX-300、日本

光電株式会社、東京)に接続する事により計測し、解析は生体情報モニタ (生体情報モニタ BP-608V Evolution、オムロン コーリン株式会社、東京)を用いて行った。心臓超音波検査 (APLIO SSA-770A(R)、東芝メディカルシステムズ株式会社、東京)は犬を右側横臥位に保定した状態にて [Thomas et al 1993]、5MHz のセクタ型超音波プローブ (PST-50AT(R)、東芝メディカルシステムズ株式会社、東京)を用いて行われた。なお、各個体の計測値として3回の心周期の平均値を使用した。心臓超音波検査による計測値として右側傍胸骨短軸像よりMモード法を用いて左室内径短縮率 (FS)を計測した。また、右側傍胸骨長軸像より得られた大動脈弁輪部の半径 (r)および左側心尖部5腔像よりパルスドプラー法を用いて得られた大動脈流速時間積分値 (AoVTI)より、以下の公式を用いて心拍出量を計測した [Lewis et al 1984]。

$$\text{心拍出量 (L/min)} = \text{心拍数 (bpm)} \times \text{AoVTI (cm)} \times (r^2 [\text{cm}] \times 3.14)$$

#### 4) 運動負荷試験

内因性交感神経刺激として運動負荷試験を行った。運動負荷試験は Day 1 および Day 7 においてカルベジロール投薬前および投薬後 1、3、6、12 および 24 時間に行われた。各犬はトレッドミル (犬の散歩道<sup>®</sup>、スナガインパルス株式会社、栃木)を用いて速度 4.5 km/h にて 10 分間走行した。走行前の安静時 (安静時心拍数)および走行中 (運動時心拍数)の心拍数を携帯型心電計にて 30 秒毎に連続的に計測した。

## 5) 血中カルベジロール濃度測定

カルベジロールの薬物動態を評価するため、カルベジロール投薬後の血中濃度を測定した。運動負荷試験直前に頸静脈より血液を採取し EDTA-2Na (ベノジエクト<sup>®</sup> II 真空採血管、テルモ株式会社、東京)にて抗凝固処理後、3000 rpm、4°Cにて10分間冷却遠心(ユニバーサル冷却遠心機 5930、株式会社久保田製作所、群馬)した後、血漿を分離した。採取した血漿を血中濃度測定までの間、-80°Cにて保存した(マイバイオ VT-78、日本フリーザー株式会社、東京)。血中濃度の測定は Behn らの方法を用いて行った [Behn et al 2001]。測定には高速液体クロマトグラフィー (SCL-20A シリーズ、島津製作所株式会社、京都)を用いた。サンプル分離は ODS C18 カラム (ODSpak F-411、4.6 mm i.d. × 150 mm, particle size 5 μm、昭和電工株式会社、東京)で行った。カラムオーブンは40°C、流速は2.0 mL/min に設定した。移動相はアセトニトリル (アセトニトリル、和光純薬工業株式会社、大阪): 2.5mM 酢酸ナトリウム (酢酸ナトリウム三水和物、和光純薬工業株式会社、大阪)を 1:1 (v/v)で、励起波長および蛍光波長はそれぞれ 285 nm および 360 nm とした。血漿 500 μl に内部標準物質 (ベラパミル 10 μg/ml、シグマアルドリッチ株式会社、セントルイス、アメリカ)を 25 μl 加えた後、水酸化ナトリウム (水酸化ナトリウム、和光純薬株式会社、大阪)を 250 μl、酢酸エチル (酢酸エチル、和光純薬株式会社、大阪)を 2.7 ml 加え、ミキサーにて1分間回転させた後、980 × g で5分間遠心した。その後、有機層のみ抽出し、真空遠心器によって乾燥固化した。残渣を 100 μl の移動相に溶解し、その中の 65 μl を高速液体クロマトグラフィーに注入することで濃度を測定した。なお、本手法における検出限界濃度は 0.5 ng/ml であった。



## 6) 統計

全てのデータを平均値  $\pm$  標準偏差にて表記した。3 群間 (コントロール、カルベジロール 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg)における各評価項目の違いは繰り返しのある二元配置分散分析 (ANOVA)を用いて解析を行い、有意差のあった場合多重比較検定 (Bonferroni 検定)を行った。P < 0.05 にて統計学的に有意差があるものとみなした。なお、全ての統計解析は GraphPad Prism software version 5 (グラフパッドソフトウェア有限公司、サンディエゴ、アメリカ)を用いて行なった。

### 3. 結果

実験期間中、カルベジロールを投薬された犬において失神や虚脱、運動不耐などのカルベジロール投薬に関連した副作用は認められなかった。

#### 1) イソプロテレノール刺激試験

イソプロテレノール刺激試験にて外因性交感神経刺激に対するカルベジロール 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg の交感神経抑制作用を評価した。カルベジロール無投薬の健常犬に対するイソプロテレノールによる陽性変時・変力作用の効果を示している心臓超音波像を図 1-1 に示している。

心拍数 (図 1-2): Day 1 においてカルベジロール 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg における心拍数はコントロールに比較してそれぞれ 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  および 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、イソプロテレノール 0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  にて 1.0 mg/kg の心拍数は 0.4 mg/kg に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。Day 7 において 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg における心拍数はコントロールに比較して 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、0.06  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノールの薬用量にて 1.0 mg/kg の心拍数は 0.4 mg/kg に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

FS (図 1-3): Day 1 においてカルベジロール 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg における FS はコントロールに比較してそれぞれ 0.06  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  および 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、0.08

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノールの薬用量にて  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における FS は  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。Day 7 において  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  および  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における FS はコントロールに比較して  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、 $0.02 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における FS は  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

心拍出量 (図 1-4) : Day 1 においてカルベジロール  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  および  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における心拍出量はコントロールに比較して  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、 $0.08 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における心拍出量は  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。Day 7 において  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  および  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における心拍出量はコントロールに比較してそれぞれ  $0.06 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  および  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にて有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、 $0.04 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  および  $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  のイソプロテレノール薬用量にて  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における心拍出量は  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

収縮期血圧 (図 1-5) : Day 1 においてカルベジロール  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  および  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における収縮期血圧はコントロールといずれのイソプロテレノール薬用量においても差を認めなかった。一方、Day 7 において  $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$  および  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$  における収縮期血圧はコントロールに比較してそれぞれ  $0.08 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上および  $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  のイソプロテレノール薬用量にて有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。

## 2) 運動負荷試験

内因性交感神経刺激に対するカルベジロールの交感神経抑制効果を評価するため、運動負荷試験を行った。Day 1においてカルベジロール 0.4 mg/kg にて投薬後 6 および 24 時間においてコントロールに比較して運動による心拍数の上昇を有意に抑制した ( $P < 0.05$ )。一方、1.0 mg/kg にて投薬後 3、6 および 24 時間においてコントロールに比較して運動時心拍数の上昇を有意に抑制した ( $P < 0.05$ )(図 1-6)。また、Day 7において 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg 共に投薬前から投薬後 24 時間までの全ての時間帯においてコントロールに比較して運動時心拍数に対する有意な低下作用を認めた ( $P < 0.05$ )(図 1-7)。また、カルベジロールは Day 1 において 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg 共にコントロールに比較して安静時心拍数の低下作用を示さなかった (図 1-6)。一方、Day 7 において 0.4 mg/kg における投薬前および投薬後 1、3、6 時間および 1.0 mg/kg における投薬後 3 および 6 時間にてコントロールに比較して有意な安静時心拍数低下作用を認めた ( $P < 0.05$ )(図 1-7)。

## 3) カルベジロール血中濃度

血中カルベジロール濃度は投薬後 1 から 3 時間にてピークを示し、その後速やかに低下した (図 1-8)。また、Day 7 におけるカルベジロール 1.0 mg/kg の投薬後 24 時間の犬 1 頭を除き、Day 1 および Day 7 における投薬後 24 時間および Day 7 における投薬前においてカルベジロールの血中濃度は全頭で検出限界以下であった。

イソプロテレノール投薬前

イソプロテレノール投薬後

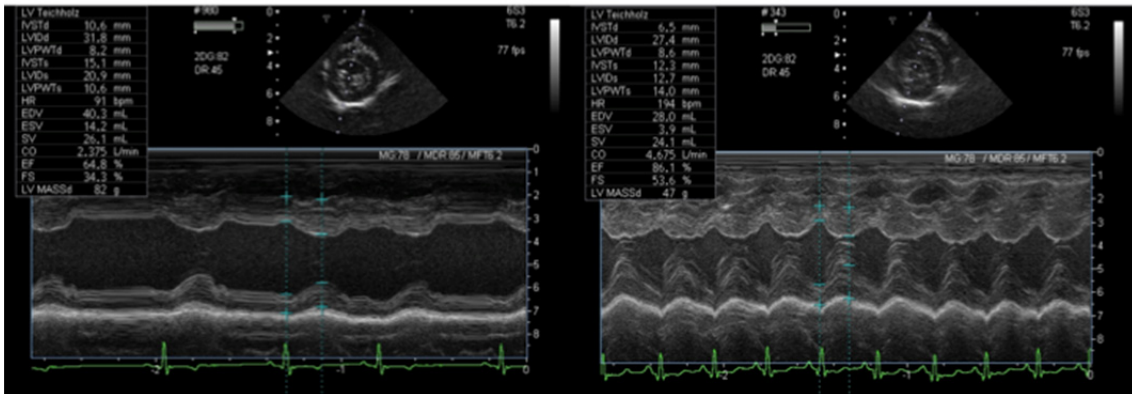


図 1-1 イソプロテレノール投薬前後における心臓超音波検査の M モード像。イソプロテレノール投薬後に心拍数上昇および左室収縮力の上昇が認められた。なお、M モード法は右傍胸骨短軸像乳頭筋レベルにおける前乳頭筋および後乳頭筋間にカーソルを合わせて計測された。

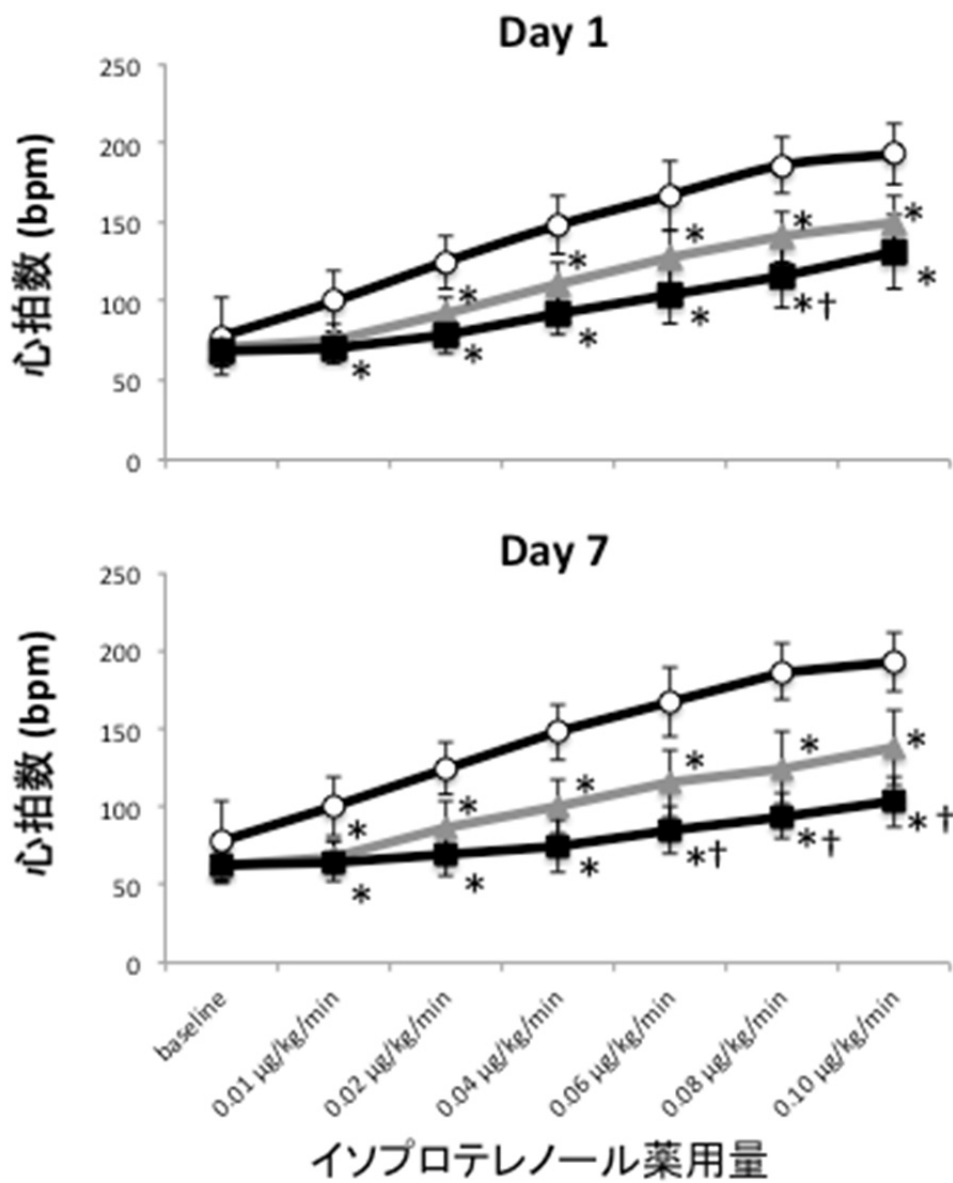


図 1-2 イソプロテレノール負荷試験における心拍数の変動。各図は投薬後 1 日 (上段)および 7 日 (下段)におけるコントロール (○)、0.4 mg/kg (▲)および 1.0 mg/kg (■)投薬後のイソプロテレノール負荷試験における心拍数の変動を示す。

\* :  $P < 0.05$ , vs. コントロール、† :  $P < 0.05$ , vs. 0.4 mg/kg。

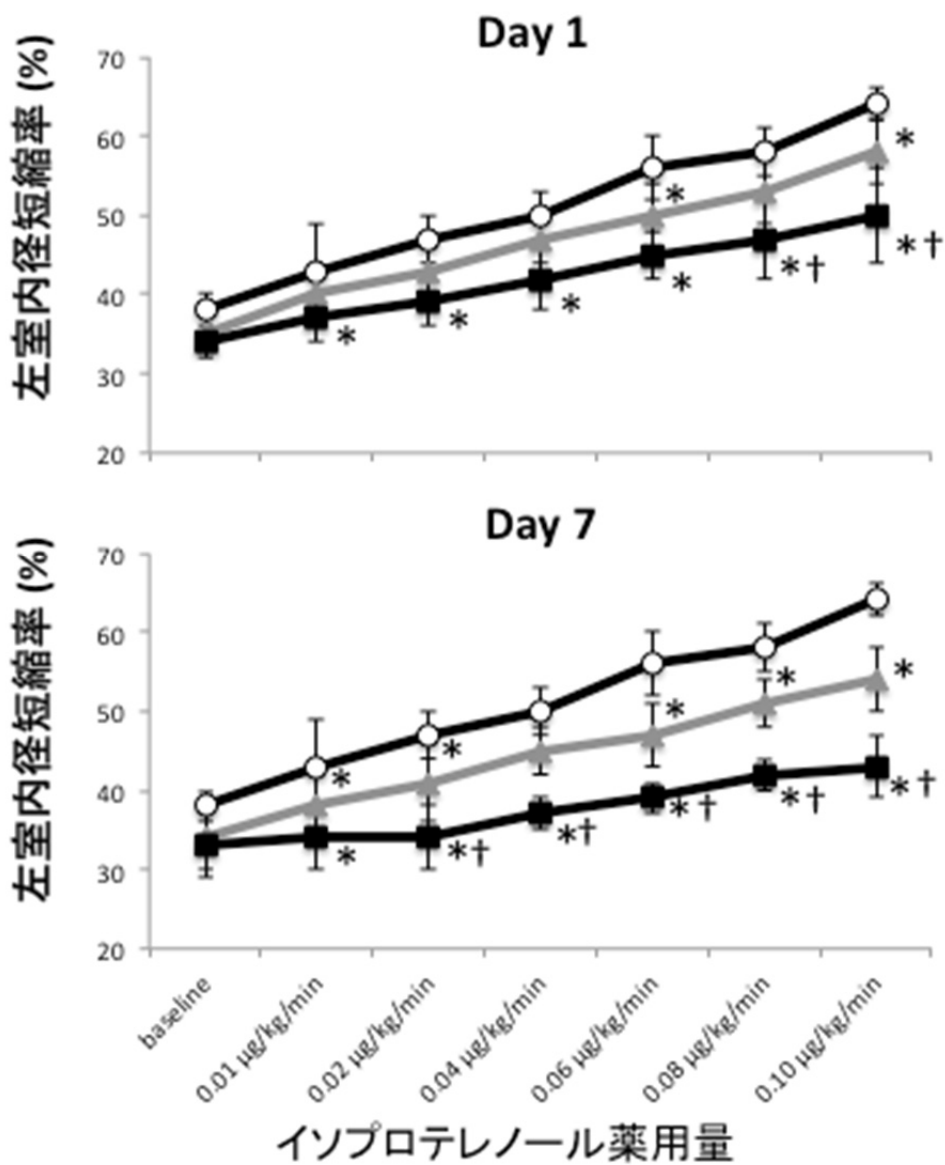


図 1-3 イソプロテレノール負荷試験における左室内径短縮率の変動。各図は投薬後 1 日 (上段)および 7 日 (下段)におけるコントロール (○)、0.4 mg/kg (▲)および 1.0 mg/kg (■)投薬後のイソプロテレノール負荷試験における左室内径短縮率の変動を示す。\* : P < 0.05, vs. コントロール、† : P < 0.05, vs. 0.4 mg/kg。

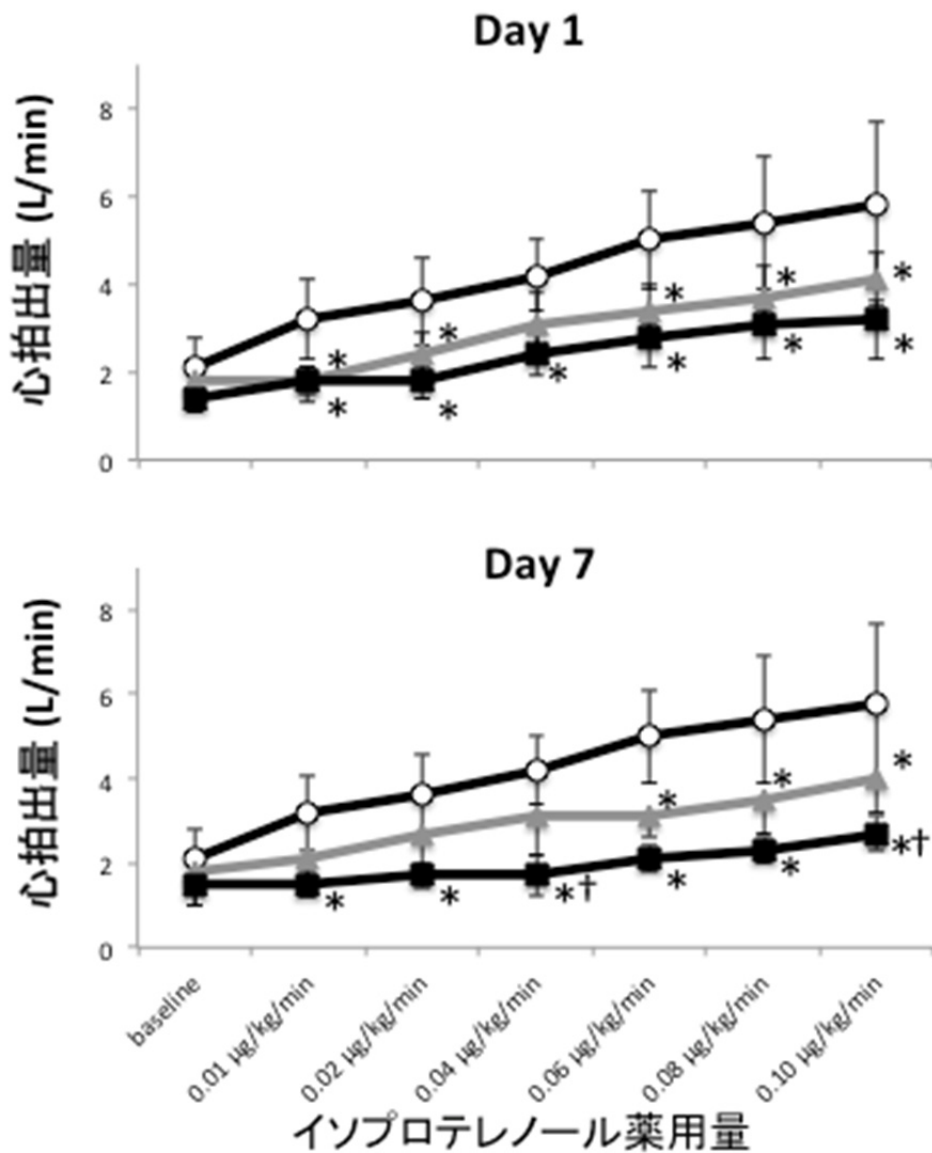


図 1-4 イソプロテレノール負荷試験における心拍出量の変動。各図は投薬後 1 日 (上段)および 7 日 (下段)におけるコントロール (○)、0.4 mg/kg (▲)および 1.0 mg/kg (■)投薬後のイソプロテレノール負荷試験における心拍出量の変動を示す。

\* :  $P < 0.05$ , vs. コントロール、† :  $P < 0.05$ , vs. 0.4 mg/kg。



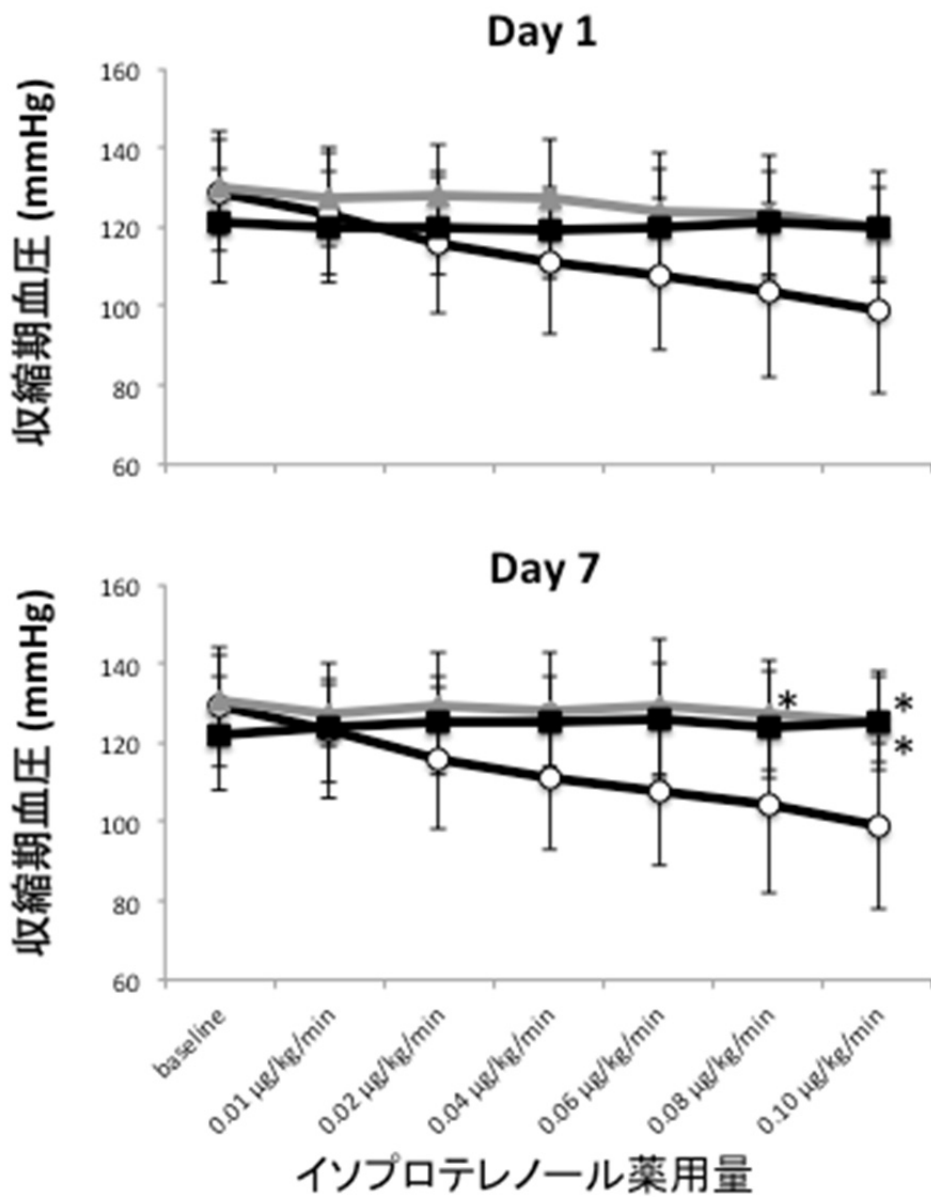


図 1-5 イソプロテレノール負荷試験における収縮期血圧の変動。各図は投薬後 1 日 (上段)および 7 日 (下段)におけるコントロール (○)、0.4 mg/kg (▲)および 1.0 mg/kg (■)投薬後のイソプロテレノール負荷試験における収縮期血圧の変動を示す。\* : P < 0.05, vs. コントロール。

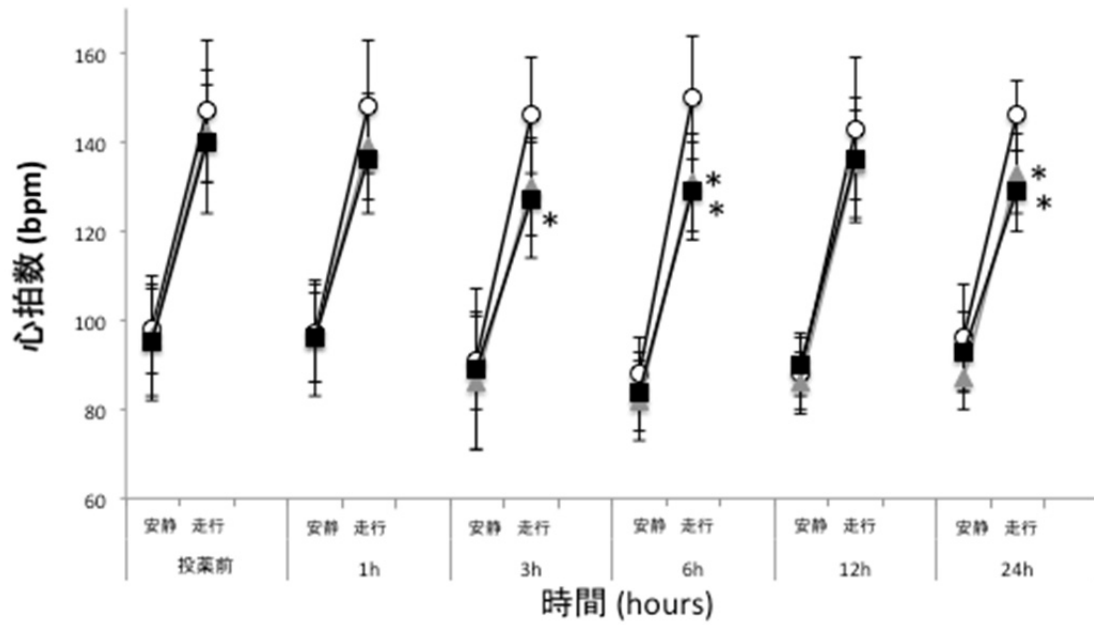


図 1-6 投薬後 1 日における運動負荷試験における心拍数の変動。○はコントロール (○)、0.4 mg/kg (▲)および 1.0 mg/kg (■)投薬後の運動負荷試験における心拍数の変動を示す。\* :  $P < 0.05$ , vs. コントロール。

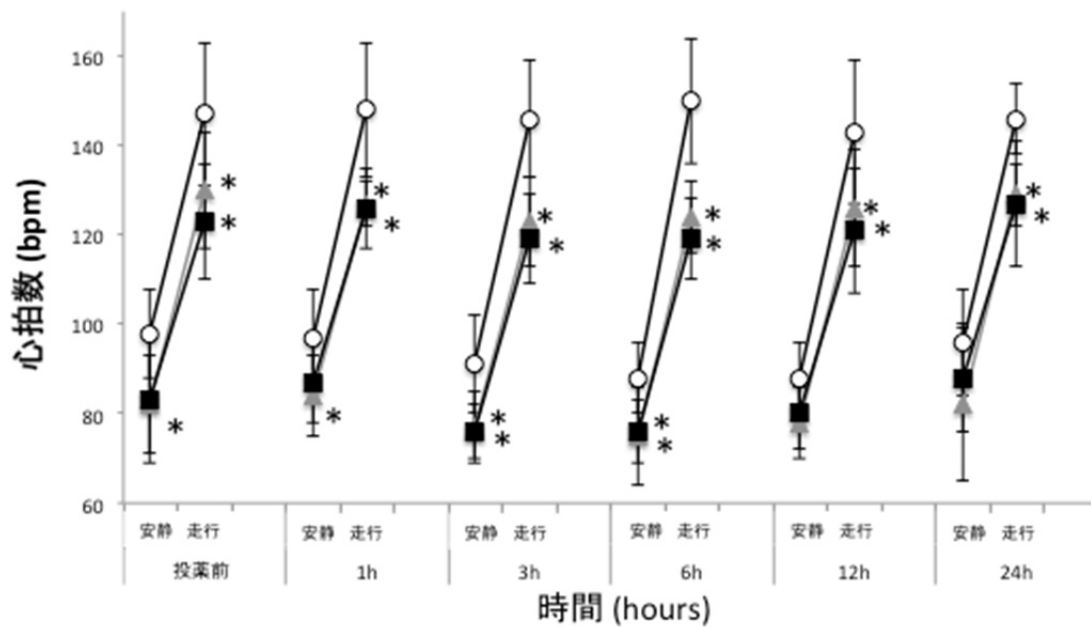
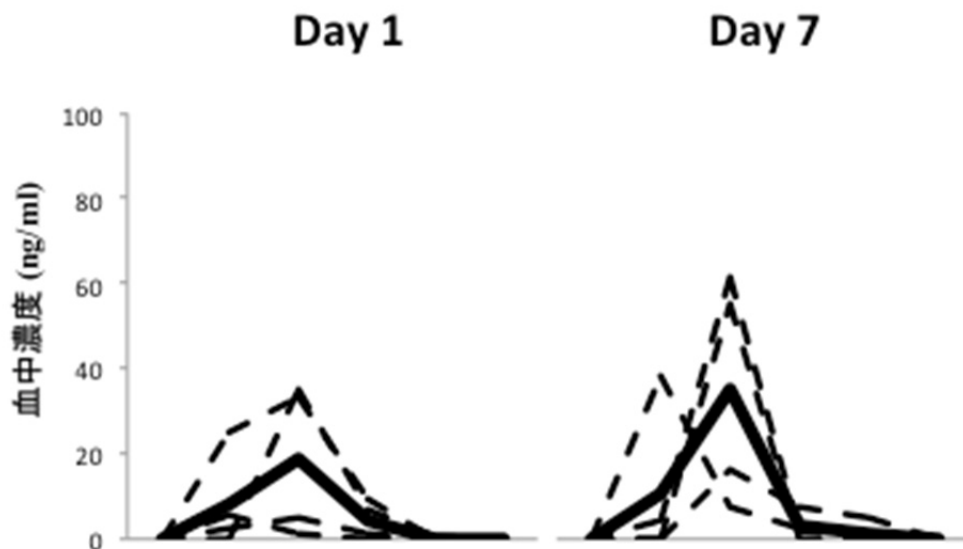


図 1-7 投薬後 7 日における運動負荷試験における心拍数の変動。○はコントロール (○)、0.4 mg/kg (▲)および 1.0 mg/kg (■)投薬後の運動負荷試験における心拍数の変動を示す。\* : P < 0.05, vs. コントロール。

(A) カルベジロール 0.4 mg/kg



(B) カルベジロール 1.0 mg/kg

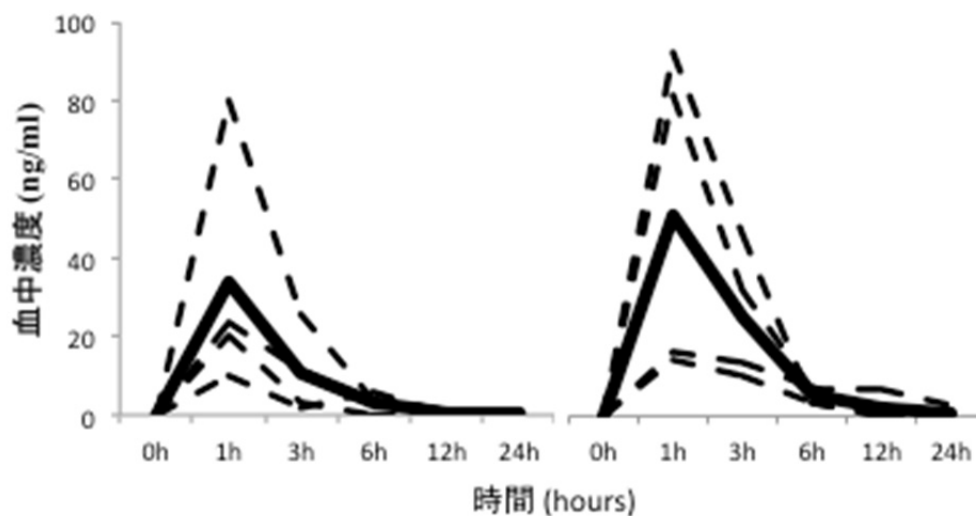


図 1-8 カルベジロール血中濃度の変動。図はカルベジロール 0.4 mg/kg (A)および 1.0 mg/kg (B)投薬後 1 日(左)および 7 日(右)におけるカルベジロールの血中濃度の変動を示す。破線は各個体の血中濃度の変動を示しており、実線は全頭の平均値を示している。

#### 4. 考察

今回の研究において、カルベジロールはイソプロテレノールによる  $\beta_1$  受容体介在性の心拍数および収縮力上昇作用および  $\beta_2$  受容体介在性血圧低下作用を有意に抑制した。また、心拍数や収縮力に対するカルベジロールの  $\beta_1$  遮断作用には用量依存性が認められた。過去の報告において健常犬におけるイソプロテレノールに対する外因性交感神経抑制作用を認めるカルベジロールの薬用量として 0.2-1.5 mg/kg が報告されている [Abbott et al 2005, Gordon et al 2006, Uechi et al 2002]。しかし、拡張型心筋症の犬における臨床試験において、低用量のカルベジロール治療 (0.3 mg/kg) は心臓超音波検査における各種パラメーターや診察時心拍数に改善を認めなかったことから、低用量では適切な交感神経抑制作用を示さない可能性を示唆している [Oyama et al 2007]。拡張型心筋症の犬において内因性の交感神経は顕著に活性化していることが報告されている [Marcondes Santos et al 2006, Ware et al 1990]。内因性交感神経活性時には中枢および末梢組織からの調節機構により副交感神経および交感神経間の自律神経バランスが調節されている [Gallagher et al 2001, Lassen et al 1989]。そのため、内因性交感神経活性時の自律神経バランスは心不全時と類似するものの、イソプロテレノールによる交感神経刺激時においては副交感神経への影響は最小限となっており、心不全時とは異なる自律神経バランスとなる [Binkley et al 1991]。また、内因性交感神経活性では循環血中カテコラミン濃度および神経終末から放出されるカテコラミン濃度が増加するが [Long and Kirby 2008]、イソプロテレノール投与では循環血液中のカテコラミン濃度を増加させるのみである。これらのことから、

内因性と外因性とでは生体に対する交感神経刺激のメカニズムが異なるため、これらの状況下においてカルベジロールは異なる薬物力学を示す可能性が考えられた。しかし、今回の結果ではカルベジロール 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg 共に健常犬に対する内因性交感神経刺激を抑制することが明らかとなった。このことから、0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg 共に内因性および外因性交感神経刺激に対して交感神経抑制作用を示すことが明らかとなった。

カルベジロールは腸管より良好に吸収され、投薬後 1 から 3 時間にて血中濃度のピークを迎える [Arsenault et al 2005, Beddis et al 2008, Schaefer et al 1998, Uechi et al 2002]。また、カルベジロールの血中濃度はその後急激に低下し、短い半減期 (72-90 分)を示す [Arsenault et al 2005, Beddis et al 2008]。そのため、薬物動態の観点よりカルベジロールの投薬間隔は犬において 12 時間以内にすることが推奨されている [Arsenault et al 2005, Gordon et al 2006]。しかしながら、本研究においてカルベジロールの血中濃度が検出限界以下である時間帯 (Day 1 における投薬後 24 時間および Day 7 における投薬前および投薬後 24 時間)においても交感神経抑制作用を示すことが明らかとなった。ヒトの *in vivo* 研究においてカルベジロールは血中濃度消失後も交感神経抑制効果が持続することが報告されており、本研究と一致する [Kindermann et al 2004]。また、この現象は他の  $\beta$  遮断薬では認められない特性であることが報告されており [Kindermann et al 2004]、この違いはカルベジロールと他の  $\beta$  遮断薬との受容体に対する結合部位や結合力、脂溶性の違い等が関与しているものと考えられる [Baker et al 2003, Baker 2005, Bristow 1997, Joseph et al 2004, Molenaar et al 2006]。これらの結果は人および犬においてカルベジロールの血中濃度はカルベジロールの効果持続時間

に關与しないことを明らかにしたものと考えられた。本実験よりカルベジロールの効果は血中濃度に依存せず 24 時間以上持続することが示されたことから、カルベジロールは 1 日 1 回の投薬にて効果的に交感神経抑制作用を示すものと考えられた。

本実験においてカルベジロールは 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg 共に同程度の安静時心拍数低下作用を認めた。安静時心拍数の低下は心不全患者の生存率改善に寄与することが報告されている [Flannery et al 2008, McAlister et al 2009]。犬においても実験的に作出した僧帽弁逆流モデルにおいて  $\beta$  遮断薬による安静時心拍数の低下は左室機能の改善をもたらすことが報告されている [Nagatsu et al 2000]。また、自然発生性粘液腫様僧帽弁疾患の犬において安静時の頻拍は負の予後因子として報告されていることから [Borgarelli et al 2008, Ebisawa et al 2012]、 $\beta$  遮断薬による心拍数抑制作用は心疾患犬の予後を改善する可能性があるものと考えられる。それゆえ、カルベジロール 0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg による安静時心拍数の低下作用は自然発生性心疾患犬に対して有効性を示す可能性が示唆された。

様々な大規模臨床試験に基づき [Packer et al 1996, Packer et al 2001]、人医領域においてカルベジロールの推奨薬用量が定められている [Hunt et al 2005]。しかしながら、推奨薬用量のカルベジロールを投薬することによりめまいや徐脈などの副作用の頻度が増加することが報告されており [Bristow et al 1996, Hori et al 2004, Ko et al 2002]、推奨薬用量まで薬用量を漸増出来ない患者が存在することが問題となる [Fonarow et al 2008, Gattis et al 2004, Mehta et al 2004]。一方で、心不全患者に対する低用量治療を支持する報告は少なく [Okamoto et al 2013]、

多くの報告において、心不全患者に対して薬用量を出来る限り漸増することを推奨している [Bristow et al 1996, Fiuzat et al 2012, Kato et al 2013, Hori et al 2004, Huang et al 2006, Nishiyama et al 2009, Yamamoto et al 2013]。現在、獣医臨床報告にて用いられているカルベジロールの維持薬用量は 0.3 mg/kg [Marconde-Santos et al 2007, Oyama et al 2007]および 1.1 mg/kg [Gordon et al 2012]である。今回の研究において、これらの臨床試験と同様の薬用量のカルベジロールが交感神経活性に対して用量依存的に陰性変時・変力作用を示すことが明らかとなった。そのため、高用量のカルベジロール治療は心機能の悪化が著しい症例において副作用を増大させる可能性があり、各症例において副作用と効果を天秤にかけた上で薬用量を調整する必要があるものと考えられた。今後、心疾患の犬におけるカルベジロールの薬用量と副作用や予後の関係性についての臨床試験が期待される。

今回の研究の制限として、本研究は健常犬で行ったものであるという点である。心不全心においては交感神経終末におけるカテコラミンの枯渇や心筋  $\beta$  受容体のダウンレギュレーションが生じている事が知られており、健常犬および心不全犬において  $\beta$  遮断薬への反応性は異なることが予想される [Javed and Deedwania 2009]。しかしながら、実験的に僧帽弁逆流を作出した犬においてカルベジロールは 0.2 mg/kg および 0.4 mg/kg 共に健常犬同様、イソプロテレノールに対する交感神経抑制作用を認めると報告されており [Uechi et al 2002]、今回の結果が心疾患犬においても外装可能な可能性が高いと考えられた。

本実験ではカルベジロールの投薬量の漸増を行わなかった。通常、カルベジロールの投薬初期には副作用の発生を抑えるために低用量より投薬を開始し、



その後徐々に維持薬用量まで漸増することが推奨されるものの、今回の研究においては維持薬用量にて投薬を開始した [Dickstein et al 2008]。そのため、本研究においてはカルベジロールの維持薬用量の投薬により急激な  $\beta$  遮断作用を生じた可能性があり、結果を過大評価している可能性があるものと考えられた。

結論として、カルベジロールは外因性および内因性交感神経刺激に対して用量依存的に交感神経抑制作用を示した。また、カルベジロールの交感神経抑制作用は血中濃度に依存せず 24 時間以上持続することが明らかとなった。それゆえ、各症例において効果と副作用を注意深く観察した上で、低用量より投薬を開始し、必要に応じた薬用量の増加が必要であるものと考えられた。

## 5. 小活

内因性および外因性交感神経刺激下の健常犬において低用量および高用量カルベジロール間の交感神経抑制作用を評価した。外因性交感神経刺激としてイソプロテレノール刺激試験を行った。また、内因性交感神経刺激として運動負荷試験を行った。イソプロテレノールに対する心拍数、左室内径短縮率および心拍出量の上昇をカルベジロールは用量依存的に抑制した。また、運動による内因性交感神経刺激に対してカルベジロールは心拍数抑制作用を24時間以上示した。カルベジロールの血中濃度は投薬後1から3時間においてピークを示し、その後、投薬後24時間において検出限界以下となった。これらのことから、カルベジロールは内因性および外因性交感神経刺激に対して用量依存的に交感神経抑制作用を示すものと考えられた。また、カルベジロールは血中濃度に依存する事なく、24時間以上の持続時間を有するものと考えられた。

## 第2章

心不全犬に対する短期的カルベジロール投薬が  
心拍数および運動耐性に及ぼす影響

## 1. 緒言

カルベジロールは  $\alpha$  遮断作用による血管拡張作用を有する非選択的  $\beta$  遮断薬である [McTavish et al 1993]。また、カルベジロールは交感神経抑制作用以外にも抗酸化作用や抗炎症作用、細胞内カルシウムの正常化作用等を有しており、多様な作用にて心機能保護作用を示す [Chua et al 2008, Cimmino et al 2011, Dandona et al 2000, Kukin et al 1999, Le et al 2013, Mochizuki et al 2007, Sun et al 2005, Zhou et al 2011, Zhuang et al 2009]。このようなカルベジロールの特異的な作用により他の  $\beta$  遮断薬に比較して心不全患者への有益な作用が強いことが期待される [Dinicolantonio et al 2013, Gilbert et al 1996, Metra et al 2005, Poole-Wilson et al 2003, Remme et al 2007]。犬に対する基礎実験において、カルベジロールは実験的に作出された拡張型心筋症の犬の左室機能や細胞内カルシウムハンドリング蛋白質発現量を改善することが報告されていると共に、これらの作用は他の  $\beta$  遮断薬に比較して顕著であることが報告されている [Le et al 2013, Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006]。これらの結果は心疾患犬に対してカルベジロールが有用な心不全治療薬となることを示唆しているものと考える。

心疾患犬に対する臨床研究において用いられているカルベジロールの維持薬用量は 0.3 および 1.1 mg/kg である [Marcondes-Santos et al 2007, Oyama et al 2007, Gordon et al 2012]。カルベジロールは用量依存的に交感神経抑制作用を示すため、これらの維持薬用量の違いは心疾患犬への交感神経抑制効果に大きな差を生じることが予想される [Abbott et al 2005, Uechi et al 2002]。また、粘液腫様僧帽弁疾患の犬においてカルベジロールの薬用量と生存率が相関する傾向が認められ

たと報告されていることから [Gordon et al 2012]、心疾患犬への交感神経抑制作用の程度は生存率の改善に関連する可能性がある。しかしながら、高用量のカルベジロール投薬により心機能の抑制が強く現れる可能性があるため、心不全の犬に対して副作用を増加させる可能性が考えられ、心不全犬に対するカルベジロール投薬が敬遠される要因となる [Bristow et al 1996, Hori et al 2004, Ko et al 2002]。しかし、心不全の犬に対する臨床用量間におけるカルベジロールの交感神経抑制作用と副作用の発生率の関係性についての報告はない。

本研究の目的は、心不全犬に対する低用量および高用量カルベジロールの心拍数および運動耐性に対する短期的影響を検討することである。

## 2. 材料および方法

本研究は日本大学生物資源科学部動物実験委員会の承認を得て、実験指針に基づき行われた。

### 1) 供試動物

日本大学生物資源科学部附属第3実験動物研究センターにて飼養されており、身体検査および血液検査、血圧測定、胸部 X 線検査、心臓超音波検査にて心臓構造および機能に異常を認めない健常ビーグル犬 5 頭 (雌 5 頭、年齢：1-3 歳、体重：8-11 kg)を用いた。各犬は1頭ずつ個別ケージにて飼育され、実験前から実験終了までは市販のドッグフードを1日2回給餌し、水は自由飲水とした。なお、運動負荷試験前12時間は自由飲水下にて絶食とした。

### 2) 心臓ペーシングワイヤーの装着

開胸術を行う前に鎮痛を目的としてメロキシカム (0.2 mg/kg)(メタカム<sup>®</sup>0.5%注射液、ベーリンガーインゲルハイムジャパン株式会社、東京)を皮下投与した。麻酔前投与薬としてアトロピン (0.025 mg/kg)(アトロピン硫酸塩注<sup>®</sup>、扶桑薬品工業株式会社、大阪)を皮下投与した後、ミダゾラム (0.2 mg/kg)(ドルミカム<sup>®</sup>注射液、アステラス製薬株式会社、東京)およびブトルファノール (0.2 mg/kg)を静脈内投与した。導入はプロポフォール (4 mg/kg)(動物用プラポフォール注<sup>®</sup>1%、マイラン製薬株式会社、大阪)を静脈内投与し、気管挿管 (トップ気管内チューブ<sup>®</sup> 8Fr、株式会社トップ、東京)後、イソフルラン (2%)(動物用吸入麻酔剤 動

物用イソフルラン<sup>®</sup>、株式会社インターベツト、東京)にて吸入麻酔を行い、維持した。犬を左側横臥位にて保定し、定法に従い右側第 4 肋間を開胸した後、心膜を切開して心臓を露出させた。右心室の冠状動脈に注意し、右冠状動脈心室枝間の右心室の心筋内にペーシングワイヤー (ペーシングワイヤー BM604A、トライテック株式会社、東京)の電極を設置した後、ペーシングワイヤー遠位端を肩甲骨背側より体外に露出させた [Shannon et al 1993]。側孔付き胸腔ドレーン (アトム多用途チューブ<sup>®</sup> 8Fr、アトムメディカル株式会社、埼玉)設置後、胸腔内を陰圧にした状態にて定法に従い閉胸した。術後は予防的抗菌薬治療としてセファゾリン (20 mg/kg)(セファメジン<sup>®</sup>α、アステラス製薬株式会社、東京)の静脈内投与を 8 時間おきに 1 日 3 回、3 日間行った。胸腔ドレーンは 6 時間おきに排液量を確認後、翌日に抜去した。手術からの回復期間として手術から実験開始までに最低でも 1 週間の期間を設けた。その間に各犬を運動プロトコールおよびハンドリングに順応させるため、各犬に対してトレッドミルによる運動練習を行った。

### 3) 実験プロトコール

体外式心臓ペースメーカー (体外式心臓ペースメーカー SEP-101、スターメディカル株式会社、東京)を用いて犬に 250 bpm にて右室高頻拍ペーシングを 3 週間行い、心不全状態を誘発した。心臓超音波検査にて心不全状態 (定義:FS <15% および左室拡張末期内径 >35 mm)を確認した後 [Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006]、高頻拍ペーシング下 (240 bpm)にてカルベジロール (カルベジロール、和光純薬工業株式会社、大阪)を 1 日 1 回 (午前 9 時)連続 5 日間、経口にて投薬

を行った。カルベジロールを1日目に0.4 mg/kg、2から5日目に1.0 mg/kgにて投薬した。運動負荷試験はペーシング前 (健常期)、ペーシング3週間後 (心不全期)、カルベジロール投薬1日目 (0.4 mg/kg)、2日目 (1.0 mg/kg)および5日目 (1.0 mg/kg 5days)に行った。

#### 4) 運動負荷試験

運動負荷試験はカルベジロール投薬前および投薬後3時間にて行った [Uechi et al 2002]。トレッドミルの速度を最初の5分間は2 km/hに設定し、その後、3、4.5、5.5 km/hに5分毎に漸増した。心拍数は携帯型心電計を用いて各速度にて5分間連続的に測定し、各速度における平均の心拍数を走行時心拍数とした。安静時心拍数としてペーシング中断後30分から走行前に5分間測定した心拍数を用いた。運動負荷試験中に犬がトレッドミル上にて足をつっぱり走行を中断するなどの走行を拒否するような動作を示した場合、運動不耐性 (図 2-1)とみなし、トレッドミルを停止し、運動負荷試験をその時点で終了した。また、犬が運動不耐を示した場合、運動不耐を示す直前まで心拍数を測定し、計測可能であった心拍数の値を走行時心拍数として用いた。

#### 5) 統計

全てのデータは平均値 ± 標準偏差にて表記した。健常期および心不全期間の各パラメーターの比較は対応のあるt検定にて行われた。また、薬剤投薬後の各群間の心拍数の比較は反復測定1元配置分散分析 (ANOVA)を用いて解析を行い、有意差のあった場合多重比較検定 (Bonferroni 検定)を行った。P < 0.05にて有意



差有りと判断した。なお、全ての統計学的処理は GraphPad Prism software version 5 を用いて行った。

(A) 走行中



(B) 運動不耐時



図 2-1 運動負荷試験中における走行時 (A)および運動不耐時 (B)の犬の状態。  
運動不耐時にはトレッドミル上にて足を突っ張り、走行を拒否している様子が観察される。

### 3. 結果

#### 1) 高頻拍ペーシングによる心不全状態の確立

3週間のペーシングの後、全ての犬において心拍数および左室拡張末期内径の有意な増加を認める ( $P < 0.05$ )と共に左室内径短縮率の有意な低下を認めた ( $P < 0.05$ )(表 2-1)。

#### 2) 運動不耐性の評価

健常期の運動負荷試験において全頭 (5/5)が全ての速度を完走した。しかし、心不全期において 3 km/h および 5.5 km/h にて 1 頭ずつが運動不耐性を示した。また、0.4 mg/kg において 3 km/h および 4.5 km/h にて 1 頭ずつが運動不耐を示すと共に、1.0 mg/kg および 1.0 mg/kg 5days において 2 km/h にて 2 頭が運動不耐性を示した (表 2-2)。

#### 3) 心拍数の評価

全ての群において 2 km/h までの走行時心拍数のデータが存在したため、安静時心拍数および 2 km/h における走行時心拍数の統計学的解析を行った。カルベジロール投薬前は全ての群間において安静時および走行時心拍数共に各群間において差を認めなかった (図 2-2)。一方、カルベジロール投薬後において安静時心拍数および走行時心拍数共に用量依存的な心拍数の減少を認めると共に、安静時心拍数における 1.0 mg/kg および 1.0 mg/kg 5days、および走行時心拍数における 1.0 mg/kg 5days にて心不全期の安静時および走行時心拍数に比較して有意

な低値を示した ( $P < 0.05$ )(図 2-3)。

表 2-1 右心室高頻拍ペースングによる心行動態の変動

	健常期	心不全期
心拍数 (bpm)	99 ± 22	127 ± 16*
左室拡張末期内径 (mm)	29 ± 2	36 ± 1*
左室内径短縮率 (%)	35.5 ± 1.3	10.7 ± 0.2*

\* : P < 0.05, vs. 健常期。

表 2-2 運動負荷試験における各速度の完走頭数

		2 km/h	3 km/h	4.5 km/h	5.5 km/h
健常期	(n = 5 頭)	5 頭	5 頭	5 頭	5 頭
心不全期	(n = 5 頭)	5 頭	4 頭	4 頭	3 頭
0.4 mg/kg	(n = 5 頭)	5 頭	4 頭	3 頭	3 頭
1.0 mg/kg	(n = 5 頭)	3 頭	3 頭	3 頭	3 頭
1.0 mg/kg 5days	(n = 5 頭)	3 頭	3 頭	3 頭	3 頭

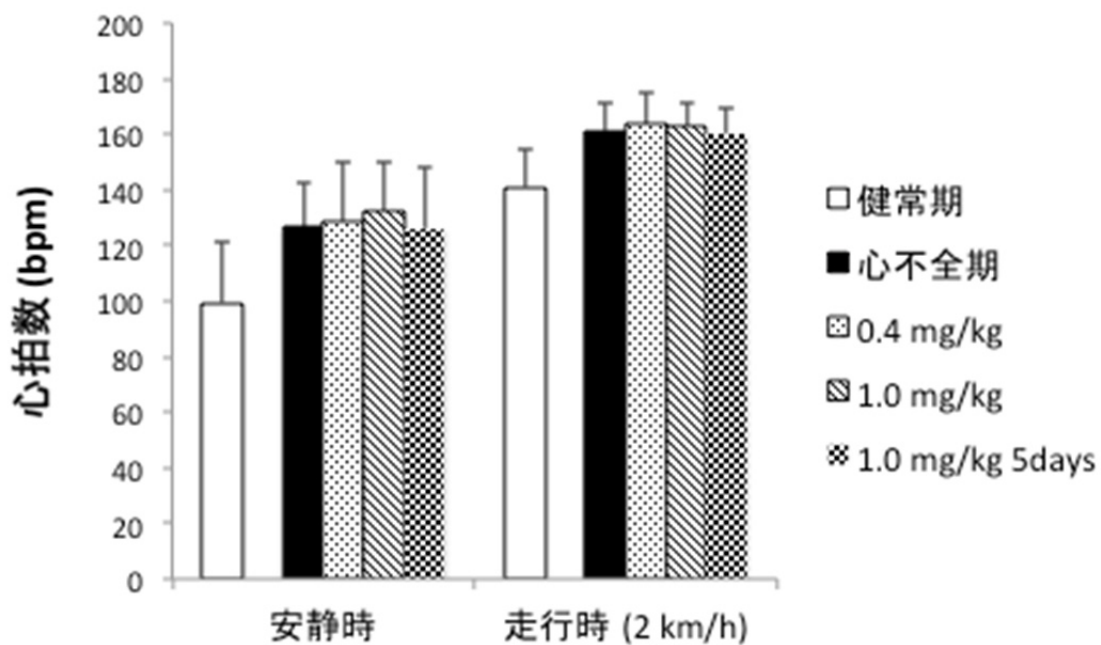


図 2-2 投薬前における安静時および走行時心拍数。図は健常期、心不全期、およびカルベジロール投薬 1 日目 (0.4 mg/kg)、2 日目 (1.0 mg/kg)、および 5 日目 (1.0 mg/kg 5days)における安静時および走行時心拍数の変動を示す。

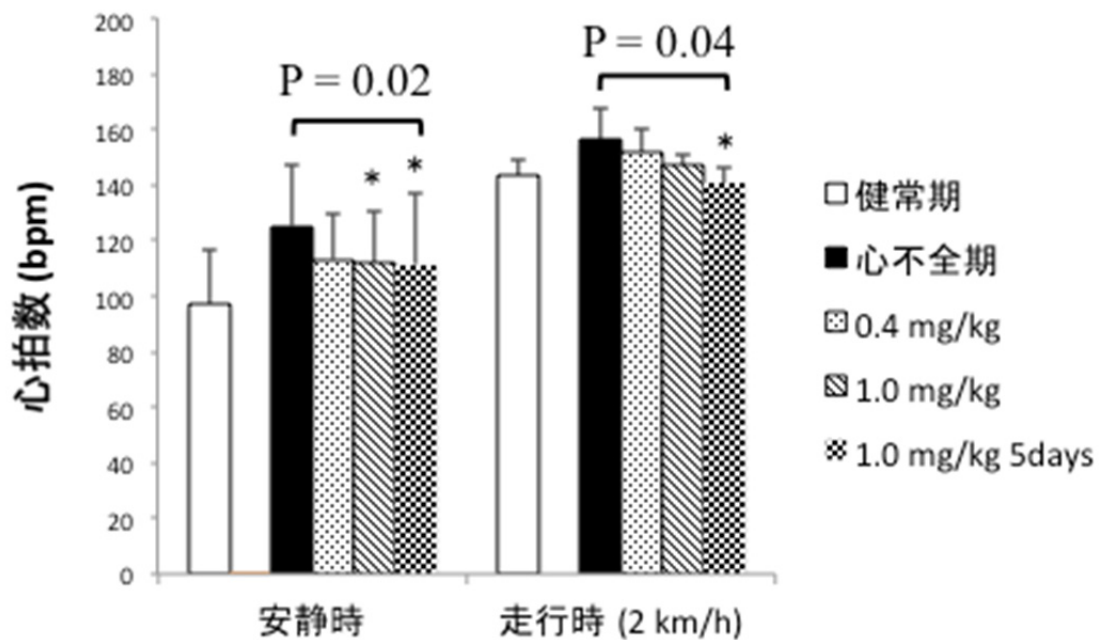


図 2-3 投薬後における安静時および走行時心拍数。図は健常期、心不全期、およびカルベジロール投薬後 1 日目 (0.4 mg/kg)、2 日目 (1.0 mg/kg)、および 5 日目 (1.0 mg/kg 5days)における安静時および運動時心拍数の変動を示す。図の上の P 値は一元配置分散分析の結果を表している。\* : P < 0.05, vs. 心不全期。



#### 4. 考察

本研究において、カルベジロールは心不全の犬の安静時および走行時心拍数に対して用量依存的に陰性変時作用を示すことが明らかとなった。心不全犬における安静時頻拍は負の予後因子であることが過去に報告されている [Borgarelli et al 2008, Ebisawa et al 2012]。また、心不全犬において、カルベジロールの薬物動態および力学の観点より、カルベジロールの高用量治療が推奨されているとともに [Arsenault et al 2005, Gordon et al 2006]、粘液腫様僧帽弁疾患の犬に対して高用量のカルベジロール治療は生存率に対して有益な作用があることが報告されている [Gordon et al 2012]。そのため、カルベジロールの高用量治療による強い陰性変時作用は心不全治療において有効性が高い可能性がある。しかしながら、人医領域においてカルベジロールの用量依存的な陰性変時・変力作用によりめまいや徐脈などの副作用の発生率も用量依存的に増加することが報告されており、心不全患者に対して本薬剤を投薬することが敬遠される要因となっている [Bristow et al 1996, Hori et al 2004, Ko et al 2002]。本実験において心不全の犬においても軽度運動時の運動不耐性の発生率が用量依存性に増加することが明らかとなった。それゆえ、心不全の犬に対して高用量のカルベジロールを使用する際にはカルベジロール投薬に関連した副作用が増加するものと考えられ、副作用に対する注意深いモニタリングが必要になるものと考えられた。

心不全患者において運動能の低下は心不全に関連した主要な症状の一つである [Wilson and Mancini 1993]。運動能を制限する心機能に関連したメカニズムは

多様であるが、運動時の心係数 (心拍出量 [L/min] ÷ 体表面積 [m<sup>2</sup>])が最大運動能に關与する事が報告されている [Hummel et al 2012]。心不全時における運動時の心拍出量の低下は骨格筋への血液還流量を低下させ、労作時疲労感の原因となる [Harrington and Coats 1997, von Haehiling et al 2013, Wilson and Mancini 1993]。本研究においてもカルベジロールによる用量依存的な走行時心拍数の低下は心不全によって既に低下している心拍出量の低下をさらに助長したものと考えられた。人医領域における心不全患者において、カルベジロールとピモベンダンの併用療法は生存率の改善に有用であることが報告されている [Murai et al 2013, Yoshikawa et al 2000]。ピモベンダンはホスホジエステラーゼIII抑制作用および Ca<sup>2+</sup>感受性増強作用を有する血管拡張性経口強心薬であり [Boyle and Leech 2012]、心不全患者の運動能を改善する [Lubsen et al 1996]。それゆえ、心不全の犬においても高用量カルベジロールを使用する際には、運動能を維持するためにピモベンダンの併用療法を実施し、カルベジロールの心機能低下作用を緩和することが有効である可能性があるものと考えられた。

本実験は以下の制限を有する。一つ目は、0.4 mg/kg および 1.0 mg/kg の投薬間に薬物の排泄期間を設けなかった点である。カルベジロールの犬における血中半減期は短い (72-90 分)ものの、1.0 mg/kg 投薬時の運動負荷試験において 0.4 mg/kg の効果が残存している可能性が考えられた [Arsenault et al 2005, Beddis et al 2008, Uechi et al 2002]。しかし、本実験において 1.0 mg/kg 投薬前の心拍数が前日の投薬前の心拍数と差がないことを確認した。二つ目はカルベジロールの投薬時に漸増期を設けなかった点である [Dickstein et al 2008]。それゆえ、導入

期からの維持薬用量の投薬は急激な  $\beta$  受容体遮断作用を引き起こした可能性があり、運動能に対する効果を過大評価している可能性があるものと考えられた。三つ目はカルベジロールの血中濃度を評価していない点である。それゆえ、我々は心不全の犬におけるカルベジロールの薬物動態を評価することが出来なかった。

結論として、カルベジロールは心不全の犬に対して用量依存的に陰性変時作用を示すとともに、軽度の運動に対する運動不耐性の発生率を増加させることが明らかとなった。そのため、各症例に必要な効果に応じて薬用量を調節するとともに、高用量使用時には副作用に対して注意深いモニタリングを行うことが心疾患犬に対して求められるものと考えられた。

## 5. 小活

低用量および高用量カルベジロールが高頻拍誘発性心不全モデル犬の心拍数および運動耐性に及ぼす短期的影響を評価した。高頻拍誘発性心不全モデル犬は3週間の右心室高頻拍により作出した。その後、カルベジロールを1日目に0.4 mg/kg、2から5日目に1.0 mg/kg投薬した。ペーシング前(健常期)、ペーシング3週間後(心不全期)、およびカルベジロール投薬後1日目(0.4 mg/kg)、2日目(1.0 mg/kg)および5日目(1.0 mg/kg連日投薬)に運動負荷試験を行った。カルベジロール1.0 mg/kgの投薬は心不全期および0.4 mg/kgに比較して軽度の運動時に運動不耐性を示す犬の数を増加させた。また、カルベジロール投薬後に安静時および走行時心拍数共に用量依存的に減少した。これらの事から、カルベジロールは心不全の犬に対して用量依存的に陰性変時作用を示すとともに、軽度の運動に対する運動不耐性の発生率の増加させることが明らかとなった。

## 第3章

心不全犬に対する心臓型アデニル酸シクラーゼ5型阻害薬の  
心血行動態に及ぼす影響

## 1. 緒言

人医領域における大規模臨床試験によりメトプロロールやビソプロロール、カルベジロールなどの  $\beta$  遮断薬は心不全患者に対する左室収縮力および生存率に対する有効性が証明されている [CIBIS-II Investigators and Committees 1999, Gilbert et al 1996, MERIT-HF Study Group 1999, Packer et al 1996, Packer et al 2001]。しかし、 $\beta$  遮断薬導入期および漸増期の一時的な心収縮力および心拍出量の低下による徐脈やめまいなどの副作用により、本薬剤に耐用できない重度心不全患者が存在することが問題となっている [Bristow et al 1996, Bristow 2000, Hori et al 2004]。それゆえ、心機能低下作用の弱い交感神経遮断薬の開発が心不全患者の新しい治療薬として期待されている。

アデニル酸シクラーゼは  $\beta$  受容体シグナリングカスケードの下流に存在する蛋白質である [Ishikawa and Homcy 1997]。アデニル酸シクラーゼは 9 種類のアイソフォームを有しており、中でも 5 型アイソフォーム (AC5) は成熟期の心臓に優位に発現しているアイソフォームである [Espinasse et al 1995, Ishikawa et al 1992, Katsushika et al 1992]。さらに、AC5 蛋白質発現量は心不全時の心筋ストレスに反応して上昇することが知られており、心不全時において心臓アデニル酸シクラーゼ全体における AC5 の優位性はさらに増すものと考えられる [Hu et al 2009]。また、AC5 過剰発現マウスにおいて基礎心機能が上昇していることが報告されていると共に、圧ストレスに対して心筋肥大が促進されることが報告されている [Esposito et al 2008, Tepe et al 1999]。そのため、心不全時の慢性交感神

経刺激に対する心臓応答において AC5 は主要な役割を担っているものと考えられている [Okumura et al 2009]。

AC5 ノックアウトマウス (AC5KO)において心不全に伴う心筋アポトーシスおよび心不全の進行が抑制されることが報告されている [Okumura et al 2003a, Okumura et al 2007]。さらに、AC5KO においてイソプロテレノールによる心筋過剰収縮が抑制されたものの、ワイルドタイプのマウスに比較してベースラインの血行動態パラメーターに変化は認められなかったことが報告されている [Okumura et al 2003b]。これらの結果は心不全時において AC5 の選択的な抑制は固有の心筋収縮機能を抑制する事なく交感神経抑制作用および心臓保護作用を示すことが期待された。

ビダラビンは帯状疱疹やヘルペスウイルス性脳炎などに対する抗ウイルス薬として長年使用されている薬剤であり、アメリカ食品医薬品局において認可されている薬剤である [Kleymann 2003]。しかしながら、近年、ビダラビンは AC5 を選択的に抑制することが明らかとなり、選択的心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型阻害薬として注目されている [Onda et al 2001]。心不全モデルマウスに対するビダラビン治療は心機能の改善および生存時間を延長することが明らかとなった [Iwatsubo et al 2012]。さらに、AC5 の薬理的抑制は *in Vitro* において心筋収縮力を抑制しないことが報告されており [Iwatsubo et al 2004]、AC5KO における結果と類似する。それゆえ、ビダラビンは心不全患者に対して効果的かつ安全に投薬できる新規交感神経遮断薬である可能性が期待された。

高頻拍誘発性心不全モデル犬は人の拡張型心筋症の病態に類似した動物モデルである [Kiuchi et al 1993, Ishikawa et al 1994, Shen et al 1999, Houser et al 2012]。

本モデルの心機能は  $\beta$  遮断薬により改善することが報告されている [Nikolaidis et al 2006, Mochizuki et al 2007]。しかしながら、実験的心不全モデル犬の心行動態に対する新規交感神経遮断薬であるビダラビンの効果は明らかになっていない。

本研究の目的は、心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型阻害薬であるビダラビンが心不全モデル犬の心行動態および心臓組織に及ぼす影響を検討すると共に、 $\beta$  遮断薬であるカルベジロールとの効果を比較検討することである。



## 2. 材料および方法

本研究は日本大学生物資源科学部動物実験委員会の承認を得て、実験指針に基づき行われた。

### 1) 供試動物

日本大学生物資源科学部附属第3実験動物研究センターにて飼養されており、身体検査および血液検査、血圧測定、胸部 X 線検査、心臓超音波検査にて心臓構造および機能に異常を認めないと共に、各種腎臓機能検査（血液検査、尿検査、尿中アルブミン・クレアチニン比測定およびイヌリנקリアランス試験による糸球体濾過量測定）にて異常を認めない健常ビーグル犬 18 頭（未避妊雌 18 頭、年齢：1-5 歳、体重：8-11 kg）を本実験に供した。なお、 $\beta$  受容体刺激に対する反応性は性差が存在することが報告されていることから [Hori et al 2008]、本研究においては雌のみを実験に供した。各犬を 1 頭ずつ個別ケージにて飼育した。実験前から実験終了まで市販のドッグフードを 1 日 2 回給餌し、水は自由飲水とした。

### 2) 心臓ペーシングワイヤーの装着

開胸術を行う前に鎮痛を目的として、メロキシカム (0.2 mg/kg) を皮下投与した。麻酔前投与薬としてアトロピン (0.025 mg/kg) を皮下投与した後、ミダゾラム (0.2 mg/kg) およびブトルファノール (0.2 mg/kg) を静脈内投与した。導入はプロポフォール (4 mg/kg) の静脈内投与にて行い、気管挿管後、イソフルラン (2%)

にて吸入麻酔を行い、麻酔を維持した。犬を左側横臥位にて保定し、定法に従い右側第 4 肋間を開胸した後、心膜を切開して心臓を露出させた。右心室の冠状動脈に注意し、右冠状動脈心室枝間の右心室心筋内にペースングワイヤーの電極を設置した後、ペースングワイヤー遠位端を肩甲骨背側より体外に露出させた [Shannon et al 1993]。側孔付き胸腔ドレーン設置後、胸腔内を陰圧にした状態で定法に従い閉胸した。術後は予防的抗菌薬治療としてセファゾリン (20 mg/kg)を 8 時間おきに 1 日 3 回、経静脈的に 3 日間投薬した。胸腔ドレーンは 6 時間おきに排液量を確認後、翌日に抜去した。手術からの回復期間として手術から実験開始までに最低でも 1 週間の期間をもうけ、その間に意識下で実験用テーブルの上にてハンドリングに順応させた。

### 3) 実験プロトコール

全ての犬においてペースング開始前に健常期の各種心行動態の測定を行った。その後、体外式心臓ペースメーカーを用いて右室高頻拍ペースング (250 回/分)を 3 週間行い、心不全状態を誘発した。心臓超音波検査にて心不全状態 (定義: FS <15%および左室拡張末期内径 >35 mm)を確認した後 [Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006]、ビダラビン投薬群 (24 mg/kg/day, n = 6)(ビダラビン一水和物、東京化成工業株式会社、東京)、カルベジロール投薬群 (1 mg/kg/day, n = 6)およびプラセボ投薬群 (n = 6)に無作為に群分けを行い、各薬剤を高頻拍下 (240 回/分)にて 7 日間投薬した。なお、本実験で使用した実験モデルに対して用いることが出来る最大薬用量をビダラビンの薬用量として設定した。また、本実験におけるカルベジロールの薬用量は人医および獣医領域における臨床維持

薬用量に設定した [Gordon et al 2012, Hunt et al 2005, Packer et al 1996, Packer et al 2001]。その後、高頻拍ペーシングを中止した後、自己拍動下にてさらに 3 日間の投薬を行った。最後の心血行動態の測定終了後、犬に麻酔前投与薬としてアトロピン (0.025 mg/kg)を皮下投与した後、鎮静剤としてミダゾラム (0.2 mg/kg) およびブトルファノール (0.2 mg/kg)を静脈内投与した。その後、プロポフォール (4 mg/kg)の静脈内投与にて導入し、KCL (2 mmol/kg)(KCL 補正薬<sup>®</sup>、大塚製薬株式会社、東京)の静脈内投与にて安楽死を行った。心停止確認後、心臓を摘出し、左房および左室の重量を測定した後、各部位を組織学的および生化学的検査に供した。

#### 4) 心血行動態測定

心血行動態の測定はペーシング開始前 (健常期)、ペーシング開始 3 週間後の心不全状態確立後 (心不全期)および投薬 7 日後 (投薬期)に行われた。心拍数測定、経胸壁心臓超音波検査、オシロメトリック法による血圧測定 (BP-100D、フクダエム・イー工業株式会社、東京)、イヌリンクリアランス法を用いた糸球体濾過量 (GFR)の測定を行った。全ての測定はペーシング中断後 30 分における、心血行動態の安定後に行った。経胸壁心臓超音波検査は 5 MHz のトランスデューサーを用い、犬を右側横臥位にて保定して行われた [Thomas et al 1993]。左室拡張末期内径 (LVIDd)および左室収縮末期内径 (LVIDs)は右側傍胸骨短軸像乳頭筋レベルにおける M モード法にて計測した後、LVIDd および LVIDs より FS が算出された。左房・大動脈径比 (LA/Ao)は右側傍胸骨短軸像大動脈レベルにて計測された。1 回拍出量 (SV)は右側傍胸骨長軸像より得られた大動脈半径 (r)

および左側心尖部四腔断面像よりパルスドプラー法にて得られた大動脈流速波形より計測された AoVTI を用いて以下の公式より算出された [Lewis et al 1984]。

$$SV (ml) = AoVTI (cm) \times (r^2 [cm] \times 3.14)$$

GFR の測定は尿中イヌリクリアランス法 (イヌリード<sup>®</sup>、株式会社富士薬品、埼玉)を用いて計測した [Nishida et al 2012]。イヌリン溶液 (100 mg/ml の原液を 0.9%生理食塩水にて希釈し 10 mg/ml に調節)を初期投与量 (0.5 mg/min/kg)にて 30 分間、橈側皮静脈に挿入した 24G の留置針より投与後、維持投与量 (0.2 mg/kg/min)に用量を変更した。維持投与量にて 15 分間投与した後、尿道カテーテル (サフィード EL バルーンカテーテル<sup>®</sup> 6Fr、テルモ株式会社、東京)より膀胱内の尿を完全に抜去し、20 ml の生理食塩水にて膀胱内を洗浄した。その後、完全排尿および膀胱洗浄を 30 分毎に 3 回繰り返し、それぞれの尿および生理食塩水の混合液を尿サンプルとして採取した。また、血液サンプルをそれぞれの完全排尿間の間地点にて行った。採取した血液は凝固させた後 (血清分離剤入スピッツ セパクリーン-A<sup>®</sup>、栄研化学株式会社、栃木)、遠心分離し血清を分離した。尿サンプルおよび血清サンプルをイヌリン濃度測定までの間、冷蔵にて保存した。イヌリン濃度の測定は株式会社エスアールエルに外注依頼し、酵素法にて行われた。なお、尿中イヌリクリアランス値は以下の式にて算出した。

$$\text{尿中イヌリクリアランス (ml/min)} = (\text{尿中イヌリン濃度 [mg/ml]} \times \text{尿量 [ml]}) / (\text{血清イヌリン濃度 [mg/ml]} \times 30 \text{ 分})$$

各犬の糸球体濾過量の値は 3 回のクリアランス値の平均の値を用いた。

## 5) イソプロテレノール負荷試験

ビダラビンおよびカルベジロールの  $\beta$  受容体遮断作用を評価するため、イソプロテレノール負荷試験を行った。イソプロテレノールを橈側皮静脈に挿入した留置針より 0.02、0.04、0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  にてシリンジポンプを用いて投与した。なお、各イソプロテレノール投与量の投与時間は 10 分とした。心拍数、観血的収縮期動脈血圧の測定、および心臓超音波検査による FS の測定を各イソプロテレノールの用量において血行動態が安定した時点で行った。観血的収縮期動脈血圧の測定は動脈カテーテルを足背動脈に設置する事によって行い、カテーテルは生理食塩水にて満たしたトランスデューサーに接続した。心拍数および収縮期血圧の解析は生体情報モニタを用いて行った。なお、イソプロテレノール負荷試験開始 20 分前に全ての犬をブトルファノール (0.1  $\text{mg}/\text{kg}$ ) の静脈内投与にて鎮静した。

## 6) 組織学的検索

心筋組織を 10%ホルマリン液 (10%中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業株式会社、大阪) にて固定した後、パラフィン (パソプレップ 568、和光純薬工業株式会社、大阪) に封入し、マイクロトームを用いて 5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切した。心筋間質線維化はシリウスレッド染色にて評価した [Iwatsubo et al 2012]。なお、シリウスレッド染色は札幌総合病理研究所に依頼した。さらに、心筋アポトーシスの評価は terminal dUTP nick end-labeling (TUNEL) 染色 (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system、プロメガ株式会社、東京) にて評価した [Okumura et al 2003, Iwatsubo et al 2004]。線維化面積および TUNEL 陽性細胞の割合は低視野 ( $\times 100$ )

にて 10 ヲ所の視野より評価し、それぞれの視野における値の平均値を用いた。なお、各組織標本の評価は BIORIVO 蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス株式会社、大阪)を用いて行った。

#### 7) AC アッセイ

細胞膜標本は液体窒素にて急速凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存された凍結心筋サンプルより抽出した [Kiuchi et al 1993]。AC 活性は Salomon らの改訂法を用いて行われ、アデニル酸シクラーゼの作動薬であるフォルスコリン (フォルスコリン、シグマアルドリッチ株式会社、セントルイス、アメリカ)負荷前後の左室サンプルにおける cAMP の産生量を測定することによって求めた [Salomon et al 1974, Iwase et al 1996b]。また、cAMP の測定はラジオイムノアッセイにより測定された。

#### 8) 統計学的解析

全てのデータは平均値  $\pm$  標準偏差にて表記した。各群間における心行動態パラメーターの比較は 2 元配置分散分析 (ANOVA)によって行われ、有意差があった際には多重比較検定を行った (Bonferroni 検定)。組織学的評価および AC 活性の各群間における比較は 1 元配置分散分析 (ANOVA)によって行われ、有意差があった際には多重比較検定 (Bonferroni 検定)が行われた。P < 0.05 の時に統計学的有意差有りとみなした。なお、全ての統計学的解析は GraphPad Prism software version 5 を用いて行った。

### 3. 結果

#### 1) 心不全状態の確立

表 3-1 はペーシング前 (健常期)およびペーシング 3 週間後 (心不全期)における左室および全身血行動態の変動を示している。3 群間において心不全の進行とともに、同程度かつ顕著な LVIDd および LVIDs の上昇、および FS、SV、平均血圧の低下を認めた。

#### 2) 各薬剤投薬後の心行動態の変化

表 3-2 は各薬剤の左室および全身血行動態に及ぼす効果について示している。プラセボ投薬群およびカルベジロール投薬群は投薬期において心不全期に比較して LVIDd および LA/Ao の有意な増加を認めた ( $P < 0.05$ )。一方、ビダラビン投薬群において LVIDd および LA/Ao の増加は抑制され、投薬期における LA/Ao において他の 2 群に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに、プラセボ投薬群は投薬期において LVIDs の有意な上昇 ( $P < 0.05$ )および FS の有意な低下 ( $P < 0.05$ )を認めたが、ビダラビン投薬群およびカルベジロール投薬群にて FS の有意な増加 ( $P < 0.05$ )を認めると共に、投薬期において両群共にプラセボ投薬群に比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。また、SV はビダラビン投薬群において投薬後に有意に増加した ( $P < 0.05$ )が、プラセボ投薬群およびカルベジロール投薬群において投薬前後に差を認めなかった。さらに、プラセボ投薬群において投薬後の GFR の低下傾向が認められたものの、ビダラビン投薬群では GFR が維持され、投薬期においてビダラビン投薬群はプラセボ投薬群に比較して

GFR の有意な高値を認めた ( $P < 0.05$ )。カルベジロール投薬群においては投薬後に GFR の増加傾向が認められたが、投薬期においてプラセボ投薬群との有意差は認められなかった。一方、心拍数および平均血圧はいずれの群においても投薬前後に差を認めなかった。

### 3) $\beta$ 遮断作用

各薬剤における  $\beta$  遮断効果を検討するため、イソプロテレノール投与時の心拍数、FS および収縮期動脈血圧を評価した (表 3-3)。

心拍数：投薬前における心拍数は各群間にて差を認めなかった。一方、各薬剤投薬後においてビダラビン投薬群およびカルベジロール投薬群の心拍数はプラセボ投薬群に比較して  $0.02 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール投薬量において有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに、カルベジロール投薬群において  $0.04 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量にてビダラビン投薬群に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

FS：投薬前の FS は各群間において差を認めなかった。一方、各薬剤投薬後においてビダラビン投薬群およびカルベジロール投薬群にてプラセボ投薬群に比較して  $0.04 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  以上のイソプロテレノール薬用量において有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

収縮期動脈血圧：投薬前の収縮期動脈血圧は各群間において差を認めなかった。一方、各薬剤投薬後はカルベジロール投薬群においてプラセボ投薬群に比較して  $0.08 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  のイソプロテレノール薬用量において有意に高値を示したが ( $P < 0.05$ )、ビダラビンおよびプラセボ投薬群間においては差を認めなかった。



#### 4) 心臓組織重量

心臓組織摘出後の左室および左房の組織重量・体重比を測定した (表 3-4)。左室重量・体重比は 3 群間において差を認めなかったが、左房重量・体重比はビダラビン投薬群においてプラセボ投薬群に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

#### 5) 組織学的検索

心臓の組織学的解析として心筋間質の線維化の評価のためにシリウスレッド染色 (図 3-1)を行うと共に、心筋細胞アポトーシスの評価のために TUNEL 染色を行った。ビダラビン投薬群およびカルベジロール投薬群の心筋間質線維化面積はプラセボ投薬群に比較して左室および左房において有意に低値を示した ( $P < 0.01$ )(図 3-2)。また、ビダラビン投薬群およびカルベジロール投薬群のアポトーシス陽性細胞率はプラセボ投薬群に比較して左室および左房において有意に低値を示した ( $P < 0.01$ ) (図 3-3)。

#### 6) AC アッセイ

図 3-4 は左室組織におけるフォルスコリン刺激に対する cAMP 産生量を示している。ビダラビンおよびカルベジロール投薬群はプラセボ投薬群に比較してフォルスコリンに対する cAMP 産生量をそれぞれ 26%および 20%抑制したが、統計学的有意差は認められなかった。

表 3-1 右心室高頻拍ペーシングによる心行動態の変動

	プラセボ (n=6)		ビダラビン (n=6)		カルベジロール (n=6)	
	健常期	心不全期	健常期	心不全期	健常期	心不全期
心拍数 (bpm)	107 ± 26	108 ± 27	94 ± 15	127 ± 11**	93 ± 13	119 ± 22*
LVIDd (mm)	28.6 ± 1.7	35.8 ± 1.5**	29.1 ± 0.9	36.3 ± 2.2**	29.0 ± 1.7	35.7 ± 1.6**
LVIDs (mm)	18.3 ± 1.2	32.0 ± 1.4**	18.5 ± 2.2	32.4 ± 2.0**	18.5 ± 1.5	31.9 ± 1.5**
LA/Ao	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.1*	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1**	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1**
FS (%)	35.2 ± 3.4	10.9 ± 0.4**	36.4 ± 7.1	10.8 ± 0.3**	36.1 ± 2.0	10.8 ± 0.3**
SV (ml)	21.6 ± 4.5	14.7 ± 3.2*	22.3 ± 2.6	15.3 ± 1.8**	19.5 ± 4.0	12.5 ± 2.1**
平均血圧 (mmHg)	110 ± 10	80 ± 10**	111 ± 11	84 ± 14**	100 ± 15	82 ± 15
GFR (ml/min/m <sup>2</sup> )	77 ± 12	74 ± 22	72 ± 13	80 ± 19	74 ± 12	63 ± 7

FS = 左室内径短縮率、GFR = 糸球体濾過量、LA/Ao = 左房・大動脈径比、LVIDd = 左室拡張末期内径、LVIDs = 左室収縮末期内径、SV = 1回拍出量。

\* : P < 0.05, vs. 健常期、\*\* : P < 0.01, vs. 健常期。

表 3-2 投薬後の心行動態の変動

	プラセボ (n = 6)			ビダラビン (n = 6)			カルベジロール (n = 6)		
	心不全期	投薬期	P 値	心不全期	投薬期	P 値	心不全期	投薬期	P 値
心拍数 (bpm)	108 ± 27	126 ± 29	n.s.	127 ± 11	127 ± 13	n.s.	119 ± 22	116 ± 25	n.s.
LVIDd (mm)	35.8 ± 1.5	36.7 ± 1.5	p < 0.01	36.3 ± 2.2	36.4 ± 2.5	n.s.	35.7 ± 1.6	37.6 ± 2.7	p < 0.05
LVIDs (mm)	32.0 ± 1.4	33.5 ± 1.2	p < 0.01	32.4 ± 2.0	31.6 ± 2.1	n.s.	31.9 ± 1.5	32.5 ± 2.2	n.s.
LA/Ao	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	p < 0.05	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1**	n.s.	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1**,†	p < 0.01
FS (%)	10.9 ± 0.4	8.7 ± 1.4	p < 0.05	10.8 ± 0.3	13.2 ± 0.7**	p < 0.001	10.8 ± 0.3	13.7 ± 0.7**	p < 0.001
SV (ml)	15.2 ± 2.5	13.3 ± 3.2	n.s.	13.4 ± 1.8	15.6 ± 2.8	p < 0.05	12.2 ± 2.4	14.0 ± 3.1	n.s.
平均血圧 (mmHg)	80 ± 10	72 ± 7	n.s.	84 ± 14	84 ± 7	n.s.	82 ± 15	80 ± 10	n.s.
GFR (ml/min/m <sup>2</sup> )	74 ± 22	56 ± 11	n.s.	80 ± 19	79 ± 19*	n.s.	63 ± 7	79 ± 25	n.s.

FS = 左室内径短縮率、GFR = 糸球体濾過量、LA/Ao = 左房・大動脈径比、LVIDd = 左室拡張末期内径、LVIDs = 左室収縮末期内径、SV = 1 回拍出量。

\* : P < 0.05, vs. プラセボ、\*\* : P < 0.01, vs. 健常期、†: P < 0.05, vs. ビダラビン。

表 3-3 イソプロテレノール負荷試験に対する各種評価項目の変動

	心拍数 (bpm)			FS (%)			収縮期動脈血圧 (mmHg)		
	プラセボ	ビダラビン	カルベジロール	プラセボ	ビダラビン	カルベジロール	プラセボ	ビダラビン	カルベジロール
治療前									
Baseline	57 ± 11	60 ± 4	72 ± 22	34.4 ± 4.0	35.4 ± 3.3	33.8 ± 2.5	127 ± 24	134 ± 11	137 ± 5
0.02 µg/kg/min	98 ± 22	101 ± 13	116 ± 17	42.3 ± 6.4	42.8 ± 3.3	40.6 ± 2.9	116 ± 26	125 ± 15	127 ± 6
0.04 µg/kg/min	135 ± 30	135 ± 23	150 ± 16	49.5 ± 4.1	48.4 ± 3.4	48.4 ± 3.3	108 ± 23	117 ± 18	119 ± 13
0.08 µg/kg/min	173 ± 26	179 ± 24	185 ± 15	57.7 ± 3.7	56.1 ± 4.1	56.7 ± 3.0	98 ± 20	113 ± 13	114 ± 11
治療後									
Baseline	59 ± 10	65 ± 5	58 ± 10	23.6 ± 3.2	25.5 ± 3.9	24.7 ± 2.5	123 ± 8	116 ± 11	126 ± 10
0.02 µg/kg/min	104 ± 21	72 ± 9**	64 ± 11**	29.4 ± 4.1	25.8 ± 3.5	25.4 ± 2.8	111 ± 10	109 ± 10	119 ± 13
0.04 µg/kg/min	138 ± 25	118 ± 21	74 ± 10**†	35.2 ± 3.5	29.3 ± 4.3*	26.2 ± 2.7**	100 ± 9	103 ± 23	118 ± 13
0.08 µg/kg/min	172 ± 19	138 ± 20**	84 ± 14**†	38.3 ± 2.8	32.4 ± 5.8*	27.7 ± 3.0**	96 ± 5	98 ± 22	118 ± 13*

FS = 左室内径短縮率。\* : P < 0.05, vs. プラセボ、\*\* : P < 0.01, vs. 健常期、†: P < 0.05, vs. ビダラビン。

表 3-4 各群における左室および左房重量・体重比

	プラセボ (n = 6)	ビダラビン (n = 6)	カルベジロール (n = 6)
左房重量・体重比 (g/kg)	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.1*	0.9 ± 0.1
左室重量・体重比 (g/kg)	5.1 ± 1.0	5.0 ± 0.3	5.2 ± 0.7

\* : P < 0.05, vs. プラセボ。

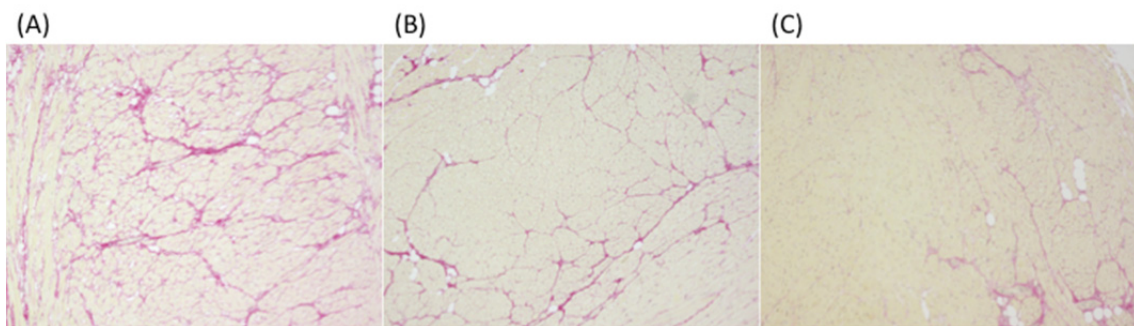


図 3-1 プラセボ (A)、ビダラビン (B)、およびカルベジロール (C)投薬群における左房組織のシリウスレッド染色像。

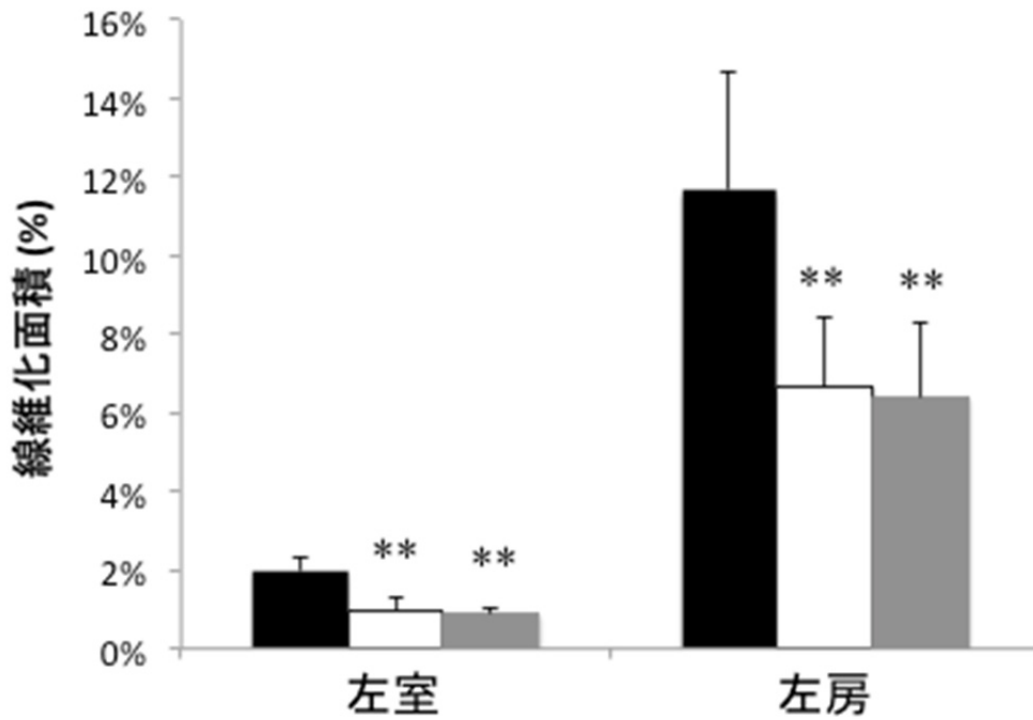


図 3-2 プラセボ (■)、ビダラビン (□)、カルベジロール (■)投薬群における左室および左房組織の線維化面積。 \*\* : P < 0.01, vs. プラセボ投薬群。

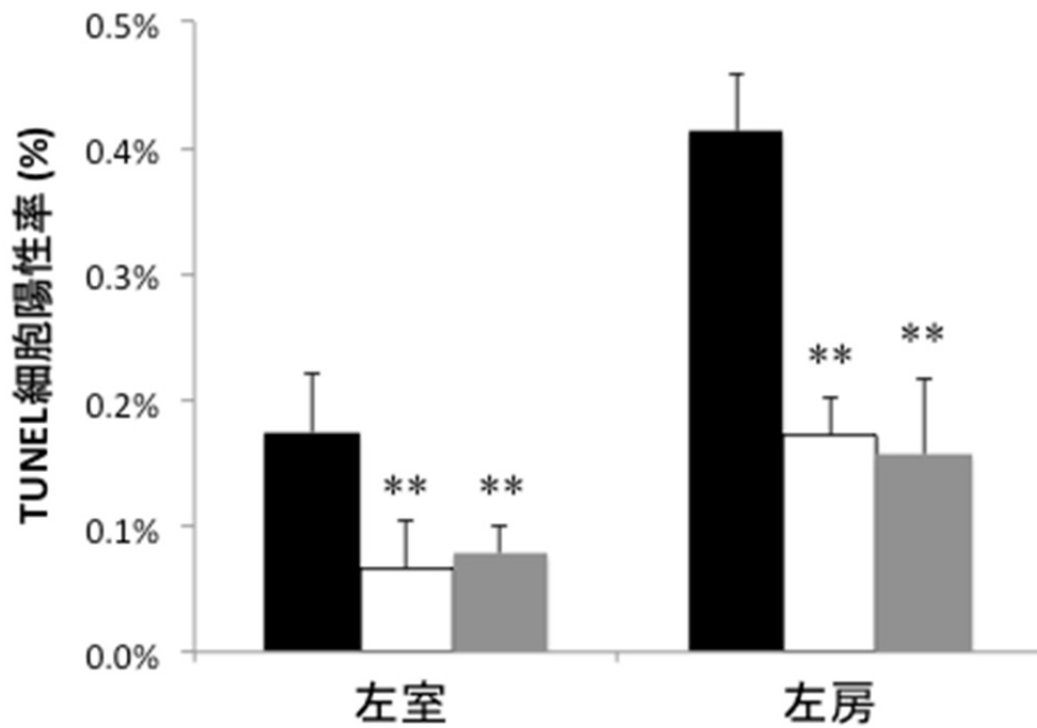


図 3-3 プラセボ (■)、ビダラビン (□)、およびカルベジロール (■)投薬群における左室および左房組織の TUNEL 陽性細胞率。 \*\* :  $P < 0.01$ , vs. プラセボ投薬群。



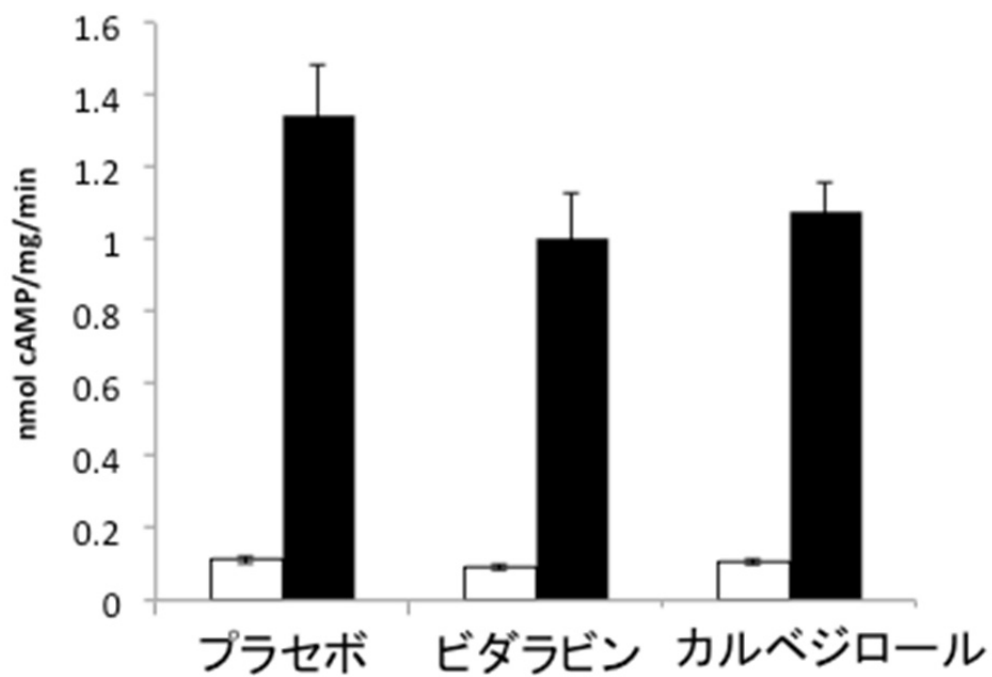


図 3-4 プラセボ、ビダラビン、およびカルベジロール投薬群における左室組織の AC 活性。図は各投薬群におけるフォルスコリン刺激前 (□)および刺激後 (■)の cAMP 産生量を示している。

#### 4. 考察

ビダラビンは抗ヘルペスウイルス薬として帯状疱疹やヘルペスウイルス性脳炎の治療薬として長年使用されてきた薬剤である [Kleymann 2003]が、近年、心臓における AC5 活性を選択的に抑制する作用を有することが明らかとなったことから新たな心不全治療薬として注目されている [Iwatsubo et al 2004, Iwatsubo et al 2012, Onda et al 2001]。AC5 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは野生型のマウスに比較して基礎心拍数や心筋収縮力が増加することが示されている [Esposito et al 2008, Tepe et al 1999]。さらに、AC5KO マウスではイソプロテレノールに対する心筋収縮力への反応性が抑制されていることが報告されている [Okumura et al 2003b, Tang et al 2006]。これらの報告は AC5 が交感神経に対する心臓の応答を担う重要な要素であることを示唆しているものと考えられる。本研究においても、ビダラビン投薬がイソプロテレノールによる陽性変時・変力作用を抑制するとともに左室心筋におけるフォルスコリンによる cAMP の産生を抑制することを明らかにした。これらの結果よりビダラビン投薬は心臓に対する交感神経活性を抑制することが明らかとなった。一方、今回の研究においてビダラビンの交感神経抑制効果は臨床薬用量のカルベジロールよりも弱いことが明らかとなった。そのため、本研究にて用いた薬用量におけるビダラビンの交感神経抑制作用は臨床薬用量におけるカルベジロールの作用に比べ投薬後の心機能低下作用が弱いことが予想されることから、ビダラビンはカルベジロールより耐用性の高い心不全治療薬である可能性が示唆された。

本研究において、ビダラビンの投薬により左室収縮力の改善、心拡大の抑制、

心筋間質線維化および心筋アポトーシスの抑制による心臓組織保護効果を認めた。過去の報告において、胸部大動脈絞扼による左心室への圧負荷に対して AC5KO マウスは左室の拡張の抑制や左室駆出率の改善、心筋アポトーシスの抑制を示したことが示されている [Okumura et al 2003a]。さらに、心筋梗塞誘発性心不全モデルマウスに対するビダラビンの投薬は左室駆出率の改善および心筋間質線維化の抑制を引き起こすことが報告されている [Iwatsubo et al 2012]。心筋線維化や心筋アポトーシスなどの心臓の組織学的変化は心機能の低下と関連していることが報告されているため [Hayakawa et al 2003, Wencker et al 2003, Xia et al 2009]、AC5 の抑制は心不全時の心臓の組織学的変化を抑制することにより、心筋収縮力や心行動態を改善するものと考えられた。

過去の報告において、ビダラビン治療による心不全への有益な効果をもたらす細胞内メカニズムはプロテインキナーゼ A を介した  $\beta$  受容体シグナリングの抑制のみならず、MEK/ERK シグナリング経路もまた関与していることが示唆されている [Iwatsubo et al 2012, Yan et al 2007]。MEK/ERK シグナリングの活性化は心筋ネクロシスおよびアポトーシスの抑制に重要な役割を担うとともに [Ravingerová et al 2003, Strohm et al 2000]、酸化ストレスへの抵抗性に関する重要なメディエーターの一種としても作用する [Finkel and Holbrook 2000, Yan et al 2007, Yoon et al 2002]。AC5KO マウスにおいて、MEK/ERK シグナリングの活性化を介して、心筋内におけるマンガンスーパーオキシドディスムターゼの増加により、酸化ストレスに対して抵抗性を示すことが明らかとなっている [Lai et al 2013, Yan et al 2007]。これらのメカニズムは、我々の実験にて認められたビダラビン治療に伴う AC5 抑制による心保護作用に関与している可能性があるもの

と考えられた。

本研究において、心不全期にプラセボ投薬群にて GFR の減少が認められたものの、ビダラビン治療により心不全による GFR の減少が抑制されることが明らかとなった。AC5 は腎臓皮質に発現しており、cAMP 産生に関与していることが報告されている [Erdorf and Seifert 2011]。さらに、AC5KO マウスにおいて交感神経刺激に対する傍糸球体細胞からのレニン分泌が抑制されることが報告されており、AC5 は腎臓におけるレニン分泌の調節に寄与しているものと考えられている [Aldehni et al 2011]。近年、心機能および腎機能の密接性を考慮した心腎連関という概念が提唱されている [Ronco et al 2008]。うっ血性心不全において、心拍出量の低下や静脈のうっ滞は腎機能の悪化を引き起こし、結果的に GFR の減少を導く要因となると考えられている [Cody et al 1988, Damman et al 2007, Seymour et al 1994]。特に、心拍出量の低下は腎血流量の低下を生じることにより [Cody et al 1988, Leithe et al 1984]、傍糸球体細胞からのレニン分泌を促進し、レニンアンギオテンシンアルドステロン系の活性化を引き起こす [Damman et al 2011]。レニンアンギオテンシンアルドステロン系の活性化は糸球体内圧の上昇および腎臓間質の線維化、交感神経の活性化により腎機能を障害する。それゆえ、心不全患者に対して AC5 の抑制によるレニン分泌の抑制はアンギオテンシン変換酵素阻害薬と同様の作用により腎臓の障害を抑制し、GFR を維持するものと考えられた [Hillege et al 2003, Lefebvre and Toutain 2004]。

第 3 世代の  $\beta$  遮断薬であるカルベジロールは左室収縮不全患者 [Gilbert et al 1996] および実験的心不全モデル犬 [Le et al 2013, Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006] の心機能を改善することが報告されている。本研究においても、カル

ベジロールはビダラビン治療と同様に心不全犬のFSを改善することが明らかとなった。しかしながら、カルベジロール治療においてはFSの改善とともに左室および左房の拡大が認められた。カルベジロールの $\beta$ 遮断作用は陰性変時・変力作用により投薬初期に心機能の一時的な低下を引き起こすことが知られている [Bristow 2000, Ko et al 2002]。過去の報告において、Bozkurtらはカルベジロール治療により心不全患者の左室駆出率の改善を認めているにもかかわらず、カルベジロールの心筋自体に対する陰性変力作用は投薬後3ヵ月においても認められることを報告している [Bozkurt et al 2012]。それゆえ、本研究においてもカルベジロールによるFSの改善は前負荷の増大などによる二次的な作用によるものであると考えられ、実際の心筋自体の収縮力は抑制されていることにより心拡大が生じたものと考えられた。これらの結果はカルベジロールによるFSの改善のメカニズムはビダラビンによるものとは異なる現象であることを示唆しているものと考えられた。

本研究はいくつかの制限を有する。一つ目は、本実験における投薬期間は10日間のみであり短期間であった点である。そのため、長期的な薬剤の安全性については明らかに出来ていない。二つ目は、心筋細胞と非心筋細胞のアポトーシスを厳密に見分けるためにローダミン抱合体小麦胚芽凝集素にて共染色を行っていない点である [Park et al 2009]。しかし、非心筋細胞のアポトーシス抑制もまた炎症やネクローシス、線維化の抑制に寄与することが明らかとなっていることから、心臓組織におけるアポトーシスの抑制は心筋保護の観点から有用であるものと考えられる [Park et al 2013]。

結論として、ビダラビンによるAC5の抑制は高頻拍誘発性心不全モデル犬の

心機能および腎機能を改善するとともに、心臓の組織学的構造を維持した。さらに、ビダラビンは外因性の交感神経刺激作用に対して抑制作用を示したが、臨床薬用量におけるカルベジロール投薬に比較して弱い作用であった。そのため、ビダラビンは  $\beta$  遮断薬に比較して弱い心機能抑制作用によって交感神経を抑制出来ることから、 $\beta$  遮断薬に耐用できない心不全患者や重度に心機能の低下した心不全患者においても耐用出来る可能性があるものと考えられた。これらの結果より、心不全治療薬としてのビダラビンによる AC5 の抑制は安全かつ有効性が高いものと考えられた。

## 5. 小活

高頻拍誘発性心不全モデル犬に対する心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型阻害薬であるビダラビンの心血行動態および心臓組織への影響を評価した。高頻拍誘発性心不全モデル犬は 3 週間の右心室高頻拍ペーシングにより作出した。その後、プラセボ、ビダラビン (24 mg/kg/day) およびカルベジロール (1 mg/kg/day) を高頻拍ペーシング下にて 1 週間投薬した。また、各薬剤投薬前後においてイソプロテレノール負荷試験を行った。ビダラビンの投薬により左室内径短縮率の改善および左房・大動脈径比の低下を認めた。さらに、ビダラビンの投薬によりイソプロテレノールによる心拍数および左室内径短縮率の上昇を抑制したが、その作用は臨床維持薬用量のカルベジロール投薬に比較して弱いものであった。また、ビダラビンは心筋間質線維化および心筋アポトーシスを抑制した。これらのことから、ビダラビンは弱い交感神経抑制効果により、心不全に伴う心筋の組織学的変化を抑制し心機能の改善をもたらすものと考えられた。

## 総括



心不全時における慢性的な交感神経活性は心筋収縮力の低下や心筋障害、心筋酸素消費量の上昇、不整脈の誘発等を引き起こし、心不全の悪化を助長する [El-Armouche and Eschenhagen 2008, Iwase et al 1996a]。そのため、心不全治療において交感神経活性を抑制することが重要となってくる [Packer et al 1996, Packer et al 2001]。心不全治療において  $\beta$  遮断薬は頻拍の防止や左室拡張能の改善、細胞内カルシウムの正常化等の様々な有益な作用を及ぼす [Chua et al 2008, Dandona et al 2000, Kukin et al 1999, Le et al 2013, Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006, Sun et al 2005, Zhou et al 2011, Zhuang et al 2009]。しかしながら、 $\beta$  遮断薬の交感神経抑制作用による一時的な心機能抑制は心不全症例の循環動態を悪化させる可能性があり、心不全症例への  $\beta$  遮断薬投薬が敬遠される要因となる [Bristow 2000, Ko et al 2002]。そのため、獣医領域における  $\beta$  遮断薬の使用に関する情報は少なく、獣医循環器専門医の間においても使用時期や使用量に関する明確な同意は得られていないことから、心疾患犬に対する  $\beta$  遮断薬の使用方法に関する明確なガイドラインが存在しないのが現状となっている [Atkins et al 2009]。

カルベジロールは非選択的  $\beta$  遮断薬であり、交感神経抑制効果のみならず、抗酸化作用や抗不整脈作用、腎機能保護作用など多様な作用を有しており、他の  $\beta$  遮断薬に比較して心不全患者への有益な作用が高いことが期待される [Bakris et al 2006, Kukin et al 1999, Le et al 2013, Mochizuki et al 2007, Nikolaidis et al 2006, Zhou et al 2011]。獣医臨床報告において用いられているカルベジロールの維持薬用量は 0.3 mg/kg および 1.1 mg/kg であるが [Marcondes-Santos et al 2007, Oyama et al 2007, Gordon et al 2012]、これらの低用量および高用量カルベジロー

ル間における交感神経抑制効果の違いは明らかになっていない。さらに、高用量カルベジロール投薬は心機能の低下に伴う副作用の発生率増加が懸念されるものの [Bristow et al 1996, Hori et al 2004]、心不全犬において薬用量と副作用の関係性についても明らかになっていない。

また、近年、新たな交感神経遮断薬として心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型阻害薬であるビダラビンが注目されている [Iwatsubo et al 2012]。ビダラビンは *in vitro* において心筋抑制作用が認められないことから [Iwatsubo et al 2004]、副作用により  $\beta$  遮断薬に耐用できない重度心不全患者に対しても安全に交感神経活性を抑制出来ることが期待されている。しかしながら、心不全犬に対するビダラビンの交感神経抑制作用や心血行動態および心臓組織への影響は明らかになっていない。

本研究では、心不全犬における交感神経遮断薬の使用法を確立するため、健常犬および心不全犬における投薬量に応じた交感神経抑制作用を評価すると共に、心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型を標的とした新規交感神経遮断薬であるビダラビンの心不全犬に対する心血行動態および心臓組織への影響を検討することを目的とした。

第 1 章より、健常犬における外因性および内因性交感神経刺激に対して低用量および高用量カルベジロールの交感神経抑制効果を比較検討した。カルベジロールは健常犬に対して低用量より用量依存的に交感神経抑制作用を示すと共に、その作用は血中濃度に依存せず 24 時間以上持続することが明らかとなった。そのため、個々の症例に対して心拍数や血圧、心収縮力などの薬物動態以外の効果モニタリング方法に応じて、カルベジロールの薬用量を調節する必要がある

ることが明らかとなった。

第 2 章では、心不全犬における低用量および高用量カルベジロールの心拍数および運動耐性に及ぼす影響を比較検討した。心不全犬においてカルベジロールは用量依存的に交感神経抑制効果を示すが、高用量カルベジロール投薬により運動不耐などの副作用の発生率が増加することが明らかとなった。過去の粘液腫様僧帽弁疾患を有する犬に対する臨床研究において、カルベジロールは用量依存的に生存率を改善する傾向が報告されていることから [Gordon et al 2012]、カルベジロールの交感神経抑制作用の程度は心疾患犬における生存率の改善に關与する可能性が考えられる。これらのことから、心不全犬においてカルベジロールを投薬する際には、低用量より使用し、症例の耐用性や効果等に注意しながら徐々に漸増していくこと、および高用量使用時には副作用に対する厳密なモニタリングが必要であるものと考えられた。

第 3 章において心不全犬に対する心臓型アデニル酸シクラーゼ 5 型阻害薬であるビダラビンの心行動態に及ぼす影響を検討した。ビダラビンは心筋間質線維化や心筋アポトーシスなどの心臓組織障害を抑制するとともに、心拡大を抑制し、心収縮力を改善することが明らかとなった。また、本研究にて用いた薬用量におけるビダラビンの交感神経抑制効果は臨床薬用量におけるカルベジロールの効果に比較して弱いことが明らかとなった。このことから、ビダラビンは  $\beta$  遮断薬に比較して、心不全患者において高い耐用性が示されることが示唆された。また、心臓組織障害を抑制すると共に、心機能改善作用を示したことから、 $\beta$  遮断薬に耐用できない心不全患者に対する新規心不全治療薬としての有効性が期待された。

これら本研究にて明らかにされた結果を臨床応用することにより、心不全犬に対して交感神経遮断薬を安全かつ有効に導入出来るものと考えられ、本研究の結果は心不全犬における交感神経遮断薬の使用方法の確立に向けた一助になるものと考えられた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科獣医内科学研究室 上地正実教授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総合臨床獣医学研究室 亘敏広教授および同獣医放射線学研究室 中山智宏教授に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり共同研究にて御指導いただきました麻布大学獣医学部獣医学科生理学第二研究室 折戸謙介教授および横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学 石川義弘教授、吹田憲司特任助教、鶴見大学歯学部生理学研究室 奥村 敏教授に深謝致します。

本研究を行う上で御協力および御助言いただきました同獣医内科学研究室 坂井 学講師および滝山直昭助手に深謝致します。

日々多忙な研究室活動の中、終始甚大なる御協力を惜しまれなかった同獣医内科学研究室の室員の皆様に深謝致します。

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

Abbott JA, Broadstone RV, Ward DL, Pyle RL. (2005): Hemodynamic effects of orally administered carvedilol in healthy conscious dogs. *Am J Vet Res.*, 66, 637-641.

Adamson PB, Gilbert EM. (2006): Reducing the risk of sudden death in heart failure with beta-blockers. *J Card Fail.*, 12, 734-746.

Aldehni F, Tang T, Madsen K, Plattner M, Schreiber A, Friis UG, Hammond HK, Han PL, Schweda F. (2011): Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension.*, 57, 460-468.

Arsenault WG, Boothe DM, Gordon SG, Miller MW, Chalkley JR, Petrikovics I. (2005): Pharmacokinetics of carvedilol after intravenous and oral administration in conscious healthy dogs. *Am J Vet Res.*, 66, 2172-2176.

Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene B, Luis-Fuentes V, Stepien R. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med.*, 23, 1142-1150.

Baker JG, Hall IP, Hill SJ. (2003): Agonist actions of "beta-blockers" provide evidence for two agonist activation sites or conformations of the human beta1-adrenoceptor. *Mol*

*Pharmacol.*, 63, 1312-1321.

Baker JG. (2005): Site of action of beta-ligands at the human beta1-adrenoceptor. *J Pharmacol Exp Ther.*, 313, 1163-1171.

Bakris GL, Hart P, Ritz E. (2006): Beta blockers in the management of chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 70, 1905-1913.

Beddies G, Fox PR, Papich MD, Kanikanti VR, Krebber R, Keene BW. (2008): Comparison of the pharmacokinetic properties of bisoprolol and carvedilol in healthy dogs. *Am J Vet Res.*, 69, 1659-1663.

Behn F, Laer S, Mir T.S, Scholz H. (2001): HPLC quantification of carvedilol in small plasma volumes from children. *Chromatographia.*, 53, 641-644.

Bers DM. (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.*, 415, 198-205.

Binkley PF, Nunziata E, Haas GJ, Nelson SD, Cody RJ. (1991): Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: demonstration in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure. *J Am Coll Cardiol.*, 18, 464-472.

Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J, 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.

Boyle KL, Leech E. (2012): A review of the pharmacology and clinical uses of pimobendan. *J Vet Emerg Crit Care.*, 22, 398-408.

Bozkurt B, Bolos M, Deswal A, Ather S, Chan W, Mann DL, Carabello B. (2012): New insights into mechanisms of action of carvedilol treatment in chronic heart failure patients--a matter of time for contractility. *J Card Fail.*, 18, 183-193.

Bristow MR, Gilbert EM, Abraham WT, Adams KF, Fowler MB, Hershberger RE, Kubo SH, Narahara KA, Ingersoll H, Krueger S, Young S, Shusterman N. (1996): Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. MOCHA Investigators. *Circulation.*, 94, 2807-2816.

Bristow MR. (1997): Mechanism of action of beta-blocking agents in heart failure. *Am J Cardiol.*, 80, 26L-40L.



Bristow MR. (2000) beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation.*, 101, 558-569.

Chua S, Sheu JJ, Chang LT, Lee FY, Wu CJ, Sun CK, Yip HK. (2008): Comparison of losartan and carvedilol on attenuating inflammatory and oxidative response and preserving energy transcription factors and left ventricular function in dilated cardiomyopathy rats. *Int Heart J.*, 49, 605-619.

CIBIS-II Investigators and Committees. (1999): The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet.*, 353, 9-13.

Cimmino G, Ibanez B, Giannarelli C, Prat-González S, Hutter R, Garcia M, Sanz J, Fuster V, Badimon JJ. (2011): Carvedilol administration in acute myocardial infarction results in stronger inhibition of early markers of left ventricular remodeling than metoprolol. *Int J Cardiol.*, 153, 256-261.

Cody RJ, Ljungman S, Covit AB, Kubo SH, Sealey JE, Pondolfino K, Clark M, James G, Laragh JH. (1988): Regulation of glomerular filtration rate in chronic congestive

heart failure patients. *Kidney Int.*, 34, 361-367.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. (1984): Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.*, 311, 819-823.

Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Su J, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A. (2003): Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 284, H676-H682.

Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Hittinger L, Berdeaux A. (2004): Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption and diastolic time in exercising dogs. *J Pharmacol Exp Ther.*, 308, 236-240.

Cullington D, Goode KM, Clark AL, Cleland JG. (2012): Heart rate achieved or beta-blocker dose in patients with chronic heart failure: which is the better target? *Eur J Heart Fail.*, 14, 737-747.

Damman K, Navis G, Smilde TD, Voors AA, van der Bij W, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. (2007): Decreased cardiac output, venous congestion and the association with renal

impairment in patients with cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail.*, 9, 872-878.

Damman K, Voors AA, Navis G, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. (2011): The cardiorenal syndrome in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis.*, 54, 144-153.

Dandona P, Karne R, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Magsino CH Jr. (2000): Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation.*, 101, 122-124.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). (2008): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J.*, 29, 2388-2442.

Dinicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, Menezes AR, O'Keefe JH. (2013): Meta-analysis of carvedilol versus Beta 1 selective Beta-blockers (atenolol, bisoprolol, metoprolol, and nebivolol). *Am J Cardiol.*, 111, 765-769.

Ebisawa T, Ohta Y, Funayama M, Morita K, Uechi M. (2012): Clinical Use of N-terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Concentrations for Assessing the Severity and Prognosis of Myxomatous Mitral Valve Disease in Dogs. *Intern J Appl Res Vet Med.*, 10, 234-242.

El-Armouche A, Eschenhagen T. (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev.*, 14, 225-241.

Erdorf M, Seifert R. (2011): Pharmacological characterization of adenylyl cyclase isoforms in rabbit kidney membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 383, 357-372.

Espinasse I, Iourgenko V, Defer N, Samson F, Hanoune J, Mercadier JJ. (1995): Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *J Mol Cell Cardiol.*, 27, 1789-1795.

Esposito G, Perrino C, Ozaki T, Takaoka H, Defer N, Petretta MP, De Angelis MC, Mao L, Hanoune J, Rockman HA, Chiariello M. (2008): Increased myocardial contractility and enhanced exercise function in transgenic mice overexpressing either adenylyl cyclase 5 or 8. *Basic Res Cardiol.*, 103, 22-30.

Finkel T, Holbrook NJ. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.*, 408, 239-247.

Fiuzat M, Wojdyla D, Kitzman D, Fleg J, Keteyian SJ, Kraus WE, Piña IL, Whellan D, O'Connor CM. (2012): Relationship of beta-blocker dose with outcomes in ambulatory heart failure patients with systolic dysfunction: results from the HF-ACTION (Heart Failure: A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training) trial. *J Am Coll Cardiol.*, 60, 208-215.

Flannery G, Gehrig-Mills R, Billah B, Krum H. (2008): Analysis of randomized controlled trials on the effect of magnitude of heart rate reduction on clinical outcomes in patients with systolic chronic heart failure receiving beta-blockers. *Am J Cardiol.*, 101, 865-869.

Fonarow GC, Abraham WT, Albert NM, Stough WG, Gheorghiade M, Greenberg BH,

O'Connor CM, Sun JL, Yancy CW, Young JB. (2008): Dosing of beta-blocker therapy before, during, and after hospitalization for heart failure (from Organized Program to Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients with Heart Failure). *Am J Cardiol.*, 102, 1524-1529.

Fox K, Borer JS, Camm AJ, Danchin N, Ferrari R, Lopez Sendon JL, Steg PG, Tardif JC, Tavazzi L, Tendera M; Heart Rate Working Group. (2007): Resting heart rate in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.*, 50, 823-830.

Fujii Y, Wakao Y. (2003): Spectral analysis of heart rate variability in dogs with mild mitral regurgitation. *Am J Vet Res.*, 64, 145-148.

Fujita T, Ishikawa Y. (2011): Apoptosis in heart failure. The role of the  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes. *Circ J.*, 75, 1811-1818.

Floras JS. (2009): Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol.*, 54, 375-385.

Gallagher KM, Fadel PJ, Strömstad M, Ide K, Smith SA, Query RG, Raven PB, Secher NH. (2001): Effects of partial neuromuscular blockade on carotid baroreflex function during exercise in humans. *J Physiol.*, 533, 861-870.

Gattis WA, O'Connor CM, Gallup DS, Hasselblad V, Gheorghiade M; IMPACT-HF Investigators and Coordinators. (2004): Predischarge initiation of carvedilol in patients hospitalized for decompensated heart failure: results of the Initiation Management Predischarge: Process for Assessment of Carvedilol Therapy in Heart Failure (IMPACT-HF) trial. *J Am Coll Cardiol.*, 43, 1534-1541.

Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR. (1996): Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation.*, 94, 2817-2825.

Gordon SG, Arsenault WG, Longnecker M, Boothe DM, Miller MW, Chalkley J. (2006): Pharmacodynamics of carvedilol in conscious, healthy dogs. *J Vet Intern Med.*, 20, 297-304.

Gordon SG, Saunders AB, Hariu CD, Boggess MM, Miller MW. (2012): Retrospective review of carvedilol administration in 38 dogs with preclinical chronic valvular heart disease. *J Vet Cardiol.*, 14, 243-252.

Guth BD, Heusch G, Seitelberger R, Ross J Jr. (1987): Mechanism of beneficial effect of beta-adrenergic blockade on exercise-induced myocardial ischemia in conscious dogs. *Circ Res.*, 60, 738-746.

Harrington D, Coats AJ. (1997): Mechanisms of exercise intolerance in congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol.*, 12, 224-232.

Hayakawa Y, Chandra M, Miao W, Shirani J, Brown JH, Dorn GW 2nd, Armstrong RC, Kitsis RN. (2003): Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice. *Circulation.*, 108, 3036-3041.

Hillege HL, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, Navis G, Grobbee DE, de Graeff PA, de Zeeuw D; CATS Randomized Trial. (2003): Accelerated decline and prognostic impact of renal function after myocardial infarction and the benefits of ACE inhibition: the



CATS randomized trial. *Eur Heart J.*, 24, 412-420.

Hori M, Sasayama S, Kitabatake A, Toyo-oka T, Handa S, Yokoyama M, Matsuzaki M, Takeshita A, Origasa H, Matsui K, Hosoda S; MUCHA Investigators. (2004): Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure: the Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. *Am Heart J.*, 147, 324-330.

Hori Y, Uechi M, Ebisawa T, Yamano S, Yoshioka K, Mutoh K. (2008): The influence of gender on cardiac fibrosis induced by sympathetic stimulation. *Chin J Physiol.*, 51, 146-151.

Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkenin JD, Sussman MA, Koch WJ; American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, Council on Clinical Cardiology, and Council on Functional Genomics and Translational Biology. (2012): Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res.*, 111, 131-150.

Hu CL, Chandra R, Ge H, Pain J, Yan L, Babu G, Depre C, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Sadoshima J, Vatner SF, Vatner DE. (2009): Adenylyl cyclase type 5 protein expression

during cardiac development and stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 297, H1776-H1782.

Huang RL, Listerman J, Goring J, Giesberg C, Nading MA, Butler J. (2006): Beta-blocker therapy for heart failure: should the therapeutic target be dose or heart rate reduction? *Congest Heart Fail.*, 12, 206-210.

Hummel YM, Bugatti S, Willemsen S, Hartog JW, Metra M, Sipkens JS, van Veldhulsen DJ, Voors AA. (2012): Functional and hemodynamic cardiac determinants of exercise capacity in patients with systolic heart failure. *Am J Cardiol.*, 110, 1336-1341.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American College of Chest Physicians; International Society for Heart and Lung Transplantation; Heart Rhythm Society. (2005): ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a

report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation.*, 112, e154-e235.

Ishikawa Y, Katsushika S, Chen L, Halnon NJ, Kawabe J, Homcy CJ. (1992): Isolation and characterization of a novel cardiac adenylylcyclase cDNA. *J Biol Chem.*, 267, 13553-13557.

Ishikawa Y, Sorota S, Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Katsushika S, Vatner DE, Vatner SF, Homcy CJ. (1994): Downregulation of adenylylcyclase types V and VI mRNA levels in pacing-induced heart failure in dogs. *J Clin Invest.*, 93, 2224-2229.

Ishikawa Y, Homcy CJ. (1997): The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res.*, 80, 297-304.

Iwase M, Bishop SP, Uechi M, Vatner DE, Shannon RP, Kudej RK, Wight DC, Wagner

TE, Ishikawa Y, Homcy CJ, Vatner SF. (1996a): Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res.*, 78, 517-524.

Iwase M, Ishikawa Y, Shen YT, Shannon RP, Sato N, Ganguly PK, Eki T, Vatner DF, Vatner SF. (1996b): Neurally mediated cardiac effects of forskolin in conscious dogs. *Am J Physiol.*, 271, H1473-H1482.

Iwatsubo K, Minamisawa S, Tsunematsu T, Nakagome M, Toya Y, Tomlinson JE, Umemura S, Scarborough RM, Levy DE, Ishikawa Y. (2004): Direct inhibition of type 5 adenylyl cyclase prevents myocardial apoptosis without functional deterioration. *J Biol Chem.*, 279, 40938-40945.

Iwatsubo K, Bravo C, Uechi M, Baljinnyam E, Nakamura T, Umemura M, Lai L, Gao S, Yan L, Zhao X, Park M, Qiu H, Okumura S, Iwatsubo M, Vatner DE, Vatner SF, Ishikawa Y. (2012): Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 302, H2622-H2628.

Javed U, Deedwania PC. (2009): Beta-adrenergic blockers for chronic heart failure. *Cardiol Rev.*, 17, 287-292.

Joseph SS, Lynham JA, Colledge WH, Kaumann AJ. (2004): Binding of (-)-[3H]-CGP12177 at two sites in recombinant human beta 1-adrenoceptors and interaction with beta-blockers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 369, 525-532.

Katsushika S, Chen L, Kawabe J, Nilakantan R, Halnon NJ, Homcy CJ, Ishikawa Y. (1992): Cloning and characterization of a sixth adenylyl cyclase isoform: types V and VI constitute a subgroup within the mammalian adenylyl cyclase family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89, 8774-8778.

Kato N, Kinugawa K, Imamura T, Muraoka H, Minatsuki S, Inaba T, Maki H, Shiga T, Hatano M, Yao A, Komuro I, Nagai R. (2013): Trend of clinical outcome and surrogate markers during titration of  $\beta$ -blocker in heart failure patients with reduced ejection fraction: relevance of achieved heart rate and  $\beta$ -blocker dose. *Circ J.*, 77, 1001-1008.

Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. (1995): Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol.*, 26, 1257-1263.

Kindermann M, Maack C, Schaller S, Finkler N, Schmidt KI, L er S, Wuttke H, Sch fers HJ, Böhm M. (2004): Carvedilol but not metoprolol reduces beta-adrenergic responsiveness after complete elimination from plasma in vivo. *Circulation.*, 109, 3182-3190.

Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Cohen DJ, Bianchi C, Homcy CJ, Vatner SF, Vatner DE. (1993): Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J Clin Invest.*, 91, 907-914.

Kleymann G. (2003): Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opin Investig Drugs.*, 12, 165-183.

Ko DT, Hebert PR, Coffey CS, Sedrakyan A, Curtis JP, Krumholz HM. (2002): Beta-blocker therapy and symptoms of depression, fatigue, and sexual dysfunction. *JAMA.*, 288, 351-357.

Kukin ML, Kalman J, Charney RH, Levy DK, Buchholz-Varley C, Ocampo ON, Eng C. (1999): Prospective, randomized comparison of effect of long-term treatment with metoprolol or carvedilol on symptoms, exercise, ejection fraction, and oxidative stress in heart failure. *Circulation.*, 99, 2645-2651.

Lai L, Yan L, Gao S, Hu CL, Ge H, Davidow A, Park M, Bravo C, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Auwerx J, Sinclair DA, Vatner SF, Vatner DE. (2013): Type 5 adenylyl cyclase increases oxidative stress by transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase via the SIRT1/FoxO3a pathway. *Circulation.*, 127, 1692-1701.

Lassen A, Mitchell JH, Reeves DR Jr, Rogers HB, Secher NH. (1989): Cardiovascular responses to brief static contractions in man with topical nervous blockade. *J Physiol.*, 409, 333-341.

Le DE, Pascotto M, Leong-Poi H, Sari I, Micari A, Kaul S. (2013): Anti-inflammatory and pro-angiogenic effects of beta blockers in a canine model of chronic ischemic cardiomyopathy: comparison between carvedilol and metoprolol. *Basic Res Cardiol.*, 108, 384.

Lefebvre HP, Toutain PL. (2004): Angiotensin-converting enzyme inhibitors in the therapy of renal diseases. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 265-281.

Leimbach WN Jr, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlöf G, Mark AL. (1986): Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation.*, 73, 913-919.

Leithe ME, Margorien RD, Hermiller JB, Unverferth DV, Leier CV. (1984): Relationship between central hemodynamics and regional blood flow in normal subjects and in patients with congestive heart failure. *Circulation.*, 69, 57-64.

Lewis JF, Kuo LC, Nelson JG, Limacher MC, Quinones MA. (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.

Long KM, Kirby R. (2008): An update on cardiovascular adrenergic receptor physiology and potential pharmacological applications in veterinary clinical care. *J Vet Emerg Crit Care.*, 18, 2-25.

Lubsen J, Just H, Hjalmarsson AC, La Framboise D, Remme WJ, Heinrich-Nols J,



Dumont JM, Seed P. (1996): Effect of pimobendan on exercise capacity in patients with heart failure: main results from the Pimobendan in Congestive Heart Failure (PICO) trial. *Heart.*, 76, 223-231.

Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. (2013): Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res.*, 113, 739-753.

Marcondes Santos M, Strunz CM, Larsson MH. (2006): Correlation between activation of the sympathetic nervous system estimated by plasma concentrations of norepinephrine and Doppler echocardiographic variables in dogs with acquired heart disease. *Am J Vet Res.*, 67, 1163-1168.

Marcondes-Santos M, Tarasoutchi F, Mansur AP, Strunz CM. (2007): Effects of carvedilol treatment in dogs with chronic mitral valvular disease. *J Vet Intern Med.*, 21, 996-1001.

McAlister FA, Wiebe N, Ezekowitz JA, Leung AA, Armstrong PW. (2009): Meta-analysis: beta-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. *Ann Intern Med.*, 150, 784-794.

McTavish D, Campoli-Richards D, Sorkin EM. (1993): Carvedilol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs.*, 45, 232-258.

Mehta PA, McDonagh S, Poole-Wilson PA, Grocott-Mason R, Dubrey SW. (2004): Heart failure in a district general hospital: are target doses of beta-blockers realistic? *QJM.*, 97, 133-139.

MERIT-HF Study Group. (1999): Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet.*, 353, 2001-2007.

Metra M, Torp-Pedersen C, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Komajda M, Remme WJ, Lutiger B, Scherhag A, Lukas MA, Charlesworth A, Poole-Wilson PA. (2005): Influence of heart rate, blood pressure, and beta-blocker dose on outcome and the differences in outcome between carvedilol and metoprolol tartrate in patients with

chronic heart failure: results from the COMET trial. *Eur Heart J.*, 26, 2259-2268.

Mochizuki M, Yano M, Oda T, Tateishi H, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. (2007): Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca<sup>2+</sup> leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J Am Coll Cardiol.*, 49, 1722-1732.

Molenaar P, Christ T, Ravens U, Kaumann A. (2006): Carvedilol blocks beta<sub>2</sub>- more than beta<sub>1</sub>-adrenoceptors in human heart. *Cardiovasc Res.*, 69, 128-139.

Murai K, Seino Y, Kimata N, Inami T, Murakami D, Abe J, Yodogawa K, Maruyama M, Takano M, Ohba T, Ibuki C, Mizuno K. (2013): Efficacy and limitations of oral inotropic agents for the treatment of chronic heart failure. *Int Heart J.*, 54, 75-81.

Nagatsu M, Spinale FG, Koide M, Tagawa H, DeFreitas G, Cooper G 4th, Carabello BA. (2000): Bradycardia and the role of beta-blockade in the amelioration of left ventricular dysfunction. *Circulation.*, 101, 653-659.

Nikolaidis LA, Poornima I, Parikh P, Magovern M, Shen YT, Shannon RP. (2006): The effects of combined versus selective adrenergic blockade on left ventricular and systemic hemodynamics, myocardial substrate preference, and regional perfusion in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.*, 47, 1871-1881.

Nishida M, Uechi M, Kono S, Harada K, Fujiwara M. (2012): Estimating glomerular filtration rate in healthy dogs using inulin without urine collection. *Res Vet Sci.*, 93, 398-403.

Nishiyama K, Tsutamoto T, Yamaji M, Kawahara C, Yamamoto T, Fujii M, Horie M. (2009): Dose-dependent prognostic effect of carvedilol in patients with chronic heart failure--special reference to transcardiac [corrected] gradient of norepinephrine. *Circ J.*, 73, 2270-2275.

Okamoto H, Hori M, Matsuzaki M, Tsutsui H, Yamazaki T, Nagai R, Yoshikawa T, Fujio Y, Nonen S, Azuma J, Izumi T, Ohashi Y, Kitabatake A; I J-CHF Investigators. (2013): Minimal dose for effective clinical outcome and predictive factors for responsiveness to carvedilol: Japanese chronic heart failure (J-CHF) study. *Int J*

*Cardiol.*, 164, 238-244.

Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee MC, Hong C, Liu J, Vatner DE, Sadoshima J, Vatner SF, Ishikawa Y. (2003a): Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100, 9986-9990.

Okumura S, Kawabe J, Yatani A, Takagi G, Lee MC, Hong C, Liu J, Takagi I, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Ishikawa Y. (2003b): Type 5 adenylyl cyclase disruption alters not only sympathetic but also parasympathetic and calcium-mediated cardiac regulation. *Circ Res.*, 93, 364-371.

Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, Bai Y, Gao S, Yuan Z, Iwatsubo K, Ulucan C, Kawabe J, Ghosh K, Vatner SF, Ishikawa Y. (2007): Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation.*, 116, 1776-1783.

Okumura S, Suzuki S, Ishikawa Y. (2009): New aspects for the treatment of cardiac

diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: effects of targeted disruption of the type 5 adenylyl cyclase gene. *J Pharmacol Sci.*, 109, 354-359.

Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazaki H, Toya Y, Sakai I, Homcy CJ, Nishikawa K, Ishikawa Y. (2001): Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem.*, 276, 47785-47793.

Oyama MA, Sisson DD, Prosek R, Bulmer BJ, Luethy MW, Fuentes VL. (2007): Carvedilol in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med.*, 21, 1272-1279.

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. (1996): The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med.*, 334, 1349-1355.

Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. (2001): Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.*, 344, 1651-1658.

Packer M. (2003): Do beta-blockers prolong survival in heart failure only by inhibiting the beta1-receptor? A perspective on the results of the COMET trial. *J Card Fail.*, 9, 429-443.

Park M, Shen YT, Gaussin V, Heyndrickx GR, Bartunek J, Resuello RR, Natividad FF, Kitsis RN, Vatner DE, Vatner SF. (2009): Apoptosis predominates in nonmyocytes in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 297, H785-H791.

Park M, Vatner SF, Yan L, Gao S, Yoon S, Lee GJ, Xie LH, Kitsis RN, Vatner DE. (2013): Novel mechanisms for caspase inhibition protecting cardiac function with chronic pressure overload. *Basic Res Cardiol.*, 108, 324.

Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A; Carvedilol Or Metoprolol European Trial Investigators. (2003): Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial.

*Lancet.*, 362, 7-13.

Ravingerová T, Barancík M, Strnisková M. (2003): Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol Cell Biochem.*, 247, 127-138.

Remme WJ, Cleland JG, Erhardt L, Spark P, Torp-Pedersen C, Metra M, Komajda M, Moullet C, Lukas MA, Poole-Wilson P, Di Lenarda A, Swedberg K. (2007): Effect of carvedilol and metoprolol on the mode of death in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.*, 9, 1128-1135.

Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. (2008): Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol.*, 52, 1527-1539.

Rush JE, Freeman LM, Hiler C, Brown DJ. (2002): Use of metoprolol in dogs with acquired cardiac disease. *J Vet Cardiol.*, 4, 23-28.

Salomon Y, Londos C, Rodbell M. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem.* 1974;58(2):541-548.

Seymour AA, Burkett DE, Asaad MM, Lanoce VM, Clemons AF, Rogers WL. (1994):



Hemodynamic, renal, and hormonal effects of rapid ventricular pacing in conscious dogs. *Lab Anim Sci.*, 44, 443-452.

Schaefer WH, Politowski J, Hwang B, Dixon F Jr, Goalwin A, Gutzait L, Anderson K, DeBrosse C, Bean M, Rhodes GR. (1998): Metabolism of carvedilol in dogs, rats, and mice. *Drug Metab Dispos.*, 26, 958-969.

Shannon RP, Komamura K, Shen YT, Bishop SP, Vatner SF. (1993): Impaired regional subendocardial coronary flow reserve in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol.*, 265, H801-H809.

Shen W, Asai K, Uechi M, Mathier MA, Shannon RP, Vatner SF, Ingwall JS. (1999): Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation.*, 100, 2113-2118.

Sisson DD. (2004): Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet Clin North Am*

*Small Anim Pract.*, 34, 1105-1126.

Strohm C, Barancik T, Brühl ML, Kilian SA, Schaper W. (2000): Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 36, 218-229.

Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY. (2005): Comparison of low and high doses of carvedilol on restoration of cardiac function and calcium-handling proteins in rat failing heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 32, 553-560.

Tang T, Lai NC, Roth DM, Drumm J, Guo T, Lee KW, Han PL, Dalton N, Gao MH. (2006): Adenylyl cyclase type V deletion increases basal left ventricular function and reduces left ventricular contractile responsiveness to beta-adrenergic stimulation. *Basic Res Cardiol.*, 101, 117-126.

Tepe NM, Lorenz JN, Yatani A, Dash R, Kranias EG, Dorn GW 2nd, Liggett SB.

(1999): Altering the receptor-effector ratio by transgenic overexpression of type V adenylyl cyclase: enhanced basal catalytic activity and function without increased cardiomyocyte beta-adrenergic signalling. *Biochemistry*, 38, 16706-16713.

Thackray SD, Ghosh JM, Wright GA, Witte KK, Nikitin NP, Kaye GC, Clark AL, Tweddel A, Cleland JG. (2006): The effect of altering heart rate on ventricular function in patients with heart failure treated with beta-blockers. *Am Heart J*, 152, e9-e13.

Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, Moses BL. (1993): Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med*, 7, 247-252.

Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. (2009): The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*, 54, 1747-1762.

Uechi M, Sasaki T, Ueno K, Yamamoto T, Ishikawa Y. (2002): Cardiovascular and renal effects of carvedilol in dogs with heart failure. *J Vet Med Sci*, 64, 469-475.

von Haehling S, Steinbeck L, Doehner W, Springer J, Anker SD. (2013): Muscle wasting in heart failure: An overview. *Int J Biochem Cell Biol.*, 45, 2257-2265.

Ware WA, Lund DD, Subieta AR, Schmid PG. (1990): Sympathetic activation in dogs with congestive heart failure caused by chronic mitral valve disease and dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc.*, 197, 1475-1481.

Watanabe K, Ohta Y, Nakazawa M, Higuchi H, Hasegawa G, Naito M, Fuse K, Ito M, Hirono S, Tanabe N, Hanawa H, Kato K, Kodama M, Aizawa Y. (2000): Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. *Br J Pharmacol.*, 130, 1489-1495.

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. (2003): A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.*, 111, 1497-1504.

Wilson JR, Mancini DM. (1993): Factors contributing to the exercise limitation of heart failure. *J Am Coll Cardiol.*, 22, 93A-98A.

Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG. (2009): Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol.*, 131, 471-481.

Yamamoto K, Origasa H, Hori M; J-DHF Investigators. (2013): Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction: the Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF). *Eur J Heart Fail.*, 15, 110-118.

Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotsu S, Ishikawa Y, Sadoshima J, Vatner SF. (2007): Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell.*, 130, 247-258.

Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. (2005): Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest.*, 115, 556-564.

Yoon SO, Yun CH, Chung AS. (2002): Dose effect of oxidative stress on signal

transduction in aging. *Mech Ageing Dev.*, 123, 1597-1604.

Yoshikawa T, Baba A, Suzuki M, Yokozuka H, Okada Y, Nagami K, Takahashi T, Mitamura H, Ogawa S. (2000): Effectiveness of carvedilol alone versus carvedilol + pimobendan for severe congestive heart failure. For the Keio Interhospital Cardiology Study (KICS) Group. *Am J Cardiol.*, 85, 1495-1497.

Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Wang A, Smith CD, Xie C, Chen W, Zhang J, Tian X, Jones PP, Zhong X, Guo A, Chen H, Zhang L, Zhu W, Yang D, Li X, Chen J, Gillis AM, Duff HJ, Cheng H, Feldman AM, Song LS, Fill M, Back TG, Chen SR. (2011): Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Nat Med.*, 17, 1003-1009.

Zhuang XF, Yin CQ, Wang HY, Sun NL. (2009): Distinctive effects of carvedilol in the non-infarct zone: remodelling of the ligated rat heart linked to oxidative stress. *J Int Med Res.*, 37, 1354-1364.