

カニクイザルを用いた
循環器病態生理学に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

中山 駿矢

2019

目次

第1章 諸論	pp. 3
第2章 循環器疾患診断のための血液検査基準値に関する研究	pp. 15
第1節 はじめに	pp. 16
第2節 材料及び方法	pp. 18
第3節 結果	pp. 22
第4節 考察	pp. 33
第5節 小括	pp. 38
第3章 正常心電図およびQT補正式に関する研究	pp. 39
第1節 はじめに	pp. 40
第2節 材料及び方法	pp. 44
第3節 結果	pp. 48
第4節 考察	pp. 59
第5節 小括	pp. 65
第4章 心エコー図検査の基準値に関する研究	pp. 66
第1節 はじめに	pp. 67
第2節 材料及び方法	pp. 69
第3節 結果	pp. 73
第4節 考察	pp. 81
第5節 小括	pp. 85
第5章 自然発症心疾患の診断と病態評価に関する研究	pp. 86

第1節	はじめに	pp. 87
第2節	材料及び方法	pp. 89
第3節	結果	pp. 94
第4節	考察	pp. 102
第5節	小括	pp. 105
第6章	総括	pp. 106
	謝辞	pp. 119
	参考文献	pp. 120

第 1 章
諸論

循環器疾患はがん（悪性新生物）や脳血管疾患とならび、ヒトの死因上位を占める疾患である。そのため現在、国内外における多くの研究機関において循環器疾患に特化した研究が行われている[1]。こうした循環器における研究の歴史は古く、William Harvey（1578-1657）が1628年に発表した血液循環論より始まる。Harveyは心臓が収縮と拡張を繰り返すことで全身に血液を送り出していることを明らかにし、血液が全身中を循環することを報告した[50]。Harveyが血液循環論を提唱するまで、血液は古代医学の父 Hippocrates（460-370 B.C.）の提唱した医学理論と、古代ギリシャの医学研究者である Galenos（130-201 A.D.）の提唱したガレノス体系に基づく学説が信じられていた。すなわち血液は、肝臓から全身への一方通行により栄養や精気を供給するとされ、心臓は単なる血液を貯める臓器として認識されていた。現代の心臓構造や機能の基礎的概念は血液循環論によるものである。

古代医学において、過剰となった体液が全身状態を悪化させるという学説は古代ギリシャのみならず、同じ地中海世界であるメソポタミアやエジプト、そして遠く離れたマヤやアステカの文明においても信じられていた。これらの文明において「血」は生命の証であり、生命エネルギーの宿る聖なる体液とされた。このように血液には生命に必要なエネルギーが含まれていると考えられる一方で疾患の原因を含むと考えられた。

疾患を診断するために、血液や尿などの検査を本格的に行い始めたのも Harveyが血液循環論を説いた頃である。欧州では Santorio Santorino（1561-

1636)による代謝エネルギー検査、Stephen Hales (1677-1761)による血圧測定、Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723)の顕微鏡による赤血球などの観察などが知られている。本邦においても江戸時代には杉田玄白の解体新書(1774)に顕微鏡の図が紹介されるなど、血液検査は積極的に取り入れられていたようである。

その後、大正、昭和にかけ尿や糞便、血液を用いた形態検査が広く臨床ツールとして用いられはじめ、その後、血算やヘモグロビン値、ABO式血液型(Karl Landsteiner, 1901)や赤血球沈降速度(Edmund Biernacki, 1894)などが報告されるようになり、これらの検査が現代の医学研究の基盤を築いてきた[108]。

血液に関する研究が進み、現代医学の基礎ができつつある頃、イタリアの解剖学者・医学者・物理学者であるLuigi Galvani (1737-1798)と物理学者Alessandro Volta (1745-1827)らがカエルの肢が生物電気によって動くことを報告した。また、1843年には動物の心筋が心拍とともに電気を発することが発見された。イタリア・ボローニャの物理学者・神経生理学者Carlo Matteucci (1811-1868)は、心臓につないだカエルの足が規則的に動く事を発見した。また1887年にはイギリスのAugustus Desiré Waller (1856-1922)が毛細管電流計を応用し、電流の変化に応じてカエルの心臓が拍動する様子を記録した。これが世界初の心電計である。その後、オランダの生理学者・医師であるWillem Einthoven (1860-1927)は、通信に用いられていた絃線電位計の感度を大幅に

上昇させ、実用的な心電計を世界で初めて開発した。Einthoven は 1900～1903 年にかけて、心電図のメカニズムに関する研究報告を続けて発表し、1924 年にノーベル医学・生理学賞を受賞した。Einthoven が確立した心電計を用いた非侵襲的心電図記録法は不整脈から心肥大、心筋梗塞まで診断することができる重要な心疾患診断ツールであり、こうした利便性から、心電図はヒト医学への臨床応用にはさほど時間はかからなかった。

同じ頃、田原淳 (1873-1952) はマールブルグ大学病理学教室のアショフ教授のもとで心臓の研究を行っていた。当時ドイツでは心臓衰弱 (心不全のような病態) は心筋の炎症だとする説が新説とされており、この研究のために田原は 120 例もの心臓標本を観察していた。その結果、田原はヒス束上部に特殊心筋線維で構成される結節があることを発見した。この結節は「田原結節」あるいは「房室結節」と命名された。同結節は心房と心室の収縮タイミングをずらすため、伝導速度をコントロールする重要な部位であることが、現在わかっている。また、田原はヒス束から下に広がるプルキンエ繊維が心室壁を走行し、心臓全体を収縮させることも発見し、心電図が心臓の内部を走る電気刺激を表すものであり、心電図が示す波形が心臓周期のどの部分を表現するかを明らかにした [96]。

こうした田原による発見をうけ、Einthoven は 1908 年、「Weiteres über das Elektrokardiogramm; さらに心電図について」という論文を発表し、この中で心電図の理論的裏付けを行った [15]。この後、「心電図学」は確立され、現在

に至るまで心疾患の診断ツールとして日々の臨床に用いられている [79, 104]。

第二次世界大戦終結後の 1945 年から、世界的に様々な科学技術が戦争から平和利用へと変化した。その中でも超音波診断機器は医学目的へ応用された技術の一つである。当初は頭蓋内診断や乳腺診断等の静止部位における組織診断が主な目的であり、拍動する組織である心臓への応用は困難であった。1949 年、「超音波診断の父」と呼ばれる Karl Theo Dussik (1908-1968) は世界で初めて脳疾患の超音波診断を実施した。当時の超音波診断装置は、一方から超音波を発生し生体を透過した超音波を反対側で受信し、その吸収効率の違いから診断を行うというものであった。1950 年には John Julian Cuttance Wild (1914-2009)、和賀井敏夫 (1924-) らは現在の主流であるパルス反射法を応用し、現在の A (Amplitude)-mode, B (Brightness)-mode, M (Motion)-mode などが開発された [75, 112]。循環器分野においては、心臓カテーテル法が 1950 年代より広く診断に取り入れられるようになった。カテーテル法はスワンガンツカテーテルを穿刺により血管内に挿入する必要がある。スウェーデンの心臓専門医 Inge Edler (1911-2001) はカテーテル法と並行し、より患者に対して侵襲の少ない方法を検討し、Carl Hellmuth Hertz (1920-1990) とともに M-mode 心エコー図法を開発した。これ以降、M-mode 心エコーを用いることで僧帽弁狭窄の診断が可能となった。

その後、1960年代後半から2次元心エコー図法（現在のB-mode法）の研究が開始された。その後、1970年代からはB-mode心エコーが臨床応用され「心電図以来の心臓診断法の革命」ともよばれるようになった[76]。

現代では2次元的な情報を得ることのできる胸部X線検査と心臓電気生理学的変化を投影する心電図検査とならび、3次元かつリアルタイムな心臓の立体的情報と機能を評価することのできる心エコー図検査は重要な循環器機能検査の一つとして医療に用いられている。

このように、循環器研究においては特にヒトの臨床研究と実験動物を用いた *in vivo* の研究が相互に重要となっている。特にマウスやラット、ウサギなどは体も小さく、繁殖が容易で系統を樹立することが容易であることから頻繁に用いられてきた。しかし、これらの実験用小動物においてはヒト医学の研究において、いくつかの問題点が知られてきた。1957年、世界40カ国以上で理想的な鎮静薬・睡眠薬として発売されたサリドマイドはマウスやラット、そしてモルモットにおいて多くの動物実験を経て市販された医薬品である。しかしながら、販売直後から妊娠初期の母体が服用すると、胎児の手・足・耳・内臓等に対し重篤な奇形をもたらすことが報告された。本邦でも1962年には販売が中止された。その後、サル類においてサリドマイドの影響を検討したところ、ヒトと同様の催奇形性があることが確認された。こうした事件を受け、よりヒトに近縁で生理学的機能も近似なサル類を用いることの重要性が世界的にも再確認されている。

最初に医学領域でサル類を用いた記録は、ギリシャの医学者 Galenos の書物に記載されている。一生涯で、350 以上の著作を発表した Galenos は、サルをはじめヒツジやブタ、ヤギ、ゾウに渡るまで多くの動物の解剖を行った。1525 年に出版された全著作集では、バーバリー・マカク (*Macaca sylvanus*) という北アフリカのマカクザルを医学生の解剖実習に用いたと述べられている。その後しばらくはサルを実験に用いたという記録はみあたらず、18 世紀になって Karl von Linne (1707-1778) が動物の分類を行った際に初めて Primate という用語を提唱した。

フランスの Louis Pasteur (1822-1895) は 19 世紀に狂犬病ウイルスをサルに通過させることでイヌに対する病原性を失うという報告を残している。これは医学実験でサル類を利用した最も古い記録である。20 世紀に入ると、ヒトとサル類の解剖学的・生理学的類似性により、医学研究への応用がさかんに行われ始めた。しかしながら、当時すでに高価であったサル類は、多くの実験への投入が困難であった。

例えば、ABO 式血液型を開発した Karl Landsteiner は 1909 年頃にウサギを用いたポリオ研究を行っていた。しかしウサギではポリオは発症せず、サル類で実験することを申請したが、高価なことを理由に実施ができなかった。その後、梅毒実験に供給されていたアカゲザルを用いて研究を再開し、ポリオは濾過膜を通過する非常に小さな病原体であることを証明した。

その後、1920 年代に世界初の実験用霊長類施設が黒海沿岸のソビエト社会主

義共和国連邦（ソ連）・スフミに実験病理学治療研究所として設立された。その後の第二次世界大戦で霊長類施設が破壊されたことより、新たにロシア領内ソチに医学霊長類研究所が建設され、現在でも 2,000 頭ほどのサルを飼育し、様々な医科学研究が行われている。

一方、米国ではイェール大学の心理学教授 Robert Mearns Yerkes (1876-1956) が 1930 年にロックフェラー財団の援助により、心理学研究を目的として米国初の実験用霊長類施設としてヤーキス霊長類生物学研究所を設立した。現在、米国内では NIH の傘下に 8 つの霊長類研究センターが設立され、3 万頭以上のサルを飼育し世界の霊長類研究をリードしている。

本邦においては 1948 年、京都大学の無給講師であった今西らにより野生ザルの調査が開始され、1967 年には京都大学附属研究施設・京都大学霊長類研究所が設立された。また 1978 年には現在の国立感染症研究所の前身である国立予防衛生研究所より茨城県・つくばに筑波医学実験用霊長類センターが設立された[8, 108]。その後、1998 年には霊長類共同利用施設が併設され、さらに研究環境が整備された。また、2002 年に滋賀医科大学・動物生命科学研究センターが設立され、実験用霊長類の飼育・実験供与も始まった[21]。

海外では中国国内に 30 万頭規模の大規模繁殖・実験施設が建設され、利用が始まっている[13]。その他にもタイなどの東南アジアを含む各国において霊長類を用いた研究は増加しており、その価値が増大している。

実験用非ヒト霊長類としてはアジア・アフリカなどに生息する旧世界ザルで

ある狭鼻猿類・マカク属のニホンザル (*Macaca fuscata*)、アカゲザル (*Macaca mulatta*)、カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、南米大陸に生息する新世界ザルである広鼻猿類のマーモセット (*Callithrix jacchus*) やリスザル (*Saimiri sciureus*) が知られ、キツネザルやメガネザルなどの原猿類に対して、これらのサル類は真猿類と呼ばれる。

カニクイザルの属する狭鼻猿類はチンパンジー (*Pan troglodytes*) やゴリラ (*Gorilla gorilla*) などの最もヒトに近いとされる類人猿と旧世界ザルとに大別され、非常にヒトと近縁であることが知られている (Fig. 1)。中でもチンパンジーはヒトとゲノムが 98% 相同とされ、ヒトを最も反映する動物として研究が行われてきた [105]。しかしながら 2011 年 12 月、米国国立衛生研究所 (US National Institutes of Health, NIH) は、動物愛護・倫理の観点からチンパンジーを使った動物実験を制限するべきとする米国医学研究所 (Institute of Medicine, IOM) の勧告を受け、世界的に医学実験使用が削減され始めた。また、NIH は 2015 年に動物実験へのチンパンジー利用を中止し、すべての個体をサンクチュアリへと移動させる方針を発表し、チンパンジーを用いた医学研究は停止された。

広鼻猿類のマーモセットは小型かつ繁殖サイクルが短く、遺伝子操作技術が確立されていることから近年実験用非ヒト霊長類の試験例の多くを占めるようになってきている。一方で遺伝的距離はマカク属に比べると遠く、身体サイズは成体で 300g 前後と小さく、外科モデルなどには適さない。一方でカニクイ

ザルは身体サイズが 3kg から 8kg と小柄ではあるものの外科モデルにも耐えうる大きさであることから、日本を始め、アジアを中心とした世界各国において実験用動物として用いられている。その用途は広く、創薬研究や心臓移植、再生医療などの最先端医療など、多岐にわたっている [2, 6, 26]。チンパンジーと比べるとゲノムの距離はヒトから多少離れるものの、他種動物に比べ非常にヒトに近縁であることから、その有用性は高く、特に創薬研究ではヒトの前臨床試験としての重要性が示唆されている。

このようにサル類は他の小動物に比べ生理学的機能や解剖学的機能が近いことから実験における有用性が示されているが、これらカニクイザルにおける基礎的研究は乏しく、現在でも多くのデータは他種動物の外挿に頼っている。

これは循環器研究についても例外ではない。近年では様々な新薬の開発や先端医学研究が発展しており、サル類の研究における需要は世界的にも更に増加している。泌尿器薬のテロジリンや抗アレルギー薬のテルフェナジンなど、いくつかの薬剤は、治験段階では副作用が検出されず製品化された。これらは心筋細胞のカリウムチャンネルに対し影響をもたらし、心臓の収縮に関与する心電図の QT 間隔を延長させることで致死的不整脈を引き起こすことが明らかになった。マウスなどの小動物では心臓収縮に関与する細胞表面のイオンチャンネルの発現がヒトと異なることが明らかとなっている。したがって前述の QT 間隔の延長が発現しないことが判明した [11, 54, 99]。

こうした背景に基づき、米国、European Union (EU)、そして日本の 3 地域

において結ばれた国際的な製薬に関する監査団体である ICH (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) は、そのガイドラインにおいて、これらの致死性不整脈や弁膜症など、心疾患をもたらす副作用に関して、サルをはじめとする大型動物を用いて検討を行う必要があると述べている [17, 18]。

また、ヒトへの応用といった点でサル類は非常にヒトに近縁であるため、iPS 細胞を用いた心筋シート移植など、ヒトへの臨床応用を前提とした挑戦的・先進的な研究においてもサルを用いた安全性試験が行われている。[59, 110, 111]

しかしながら、サル類における医学研究の歴史はマウスなどの他種動物に比べ圧倒的に短く、その知見も限られている。特に循環器に関する知見は乏しく、血液学や動脈血液ガス、前述の心電図や心エコー図検査における報告はほとんど存在していない。本研究では、医科学研究において重要な役割を果たす実験用サル類に関して、主に循環器疾患研究分野に有用なサル類心疾患モデルを確立するべく検討を行った。

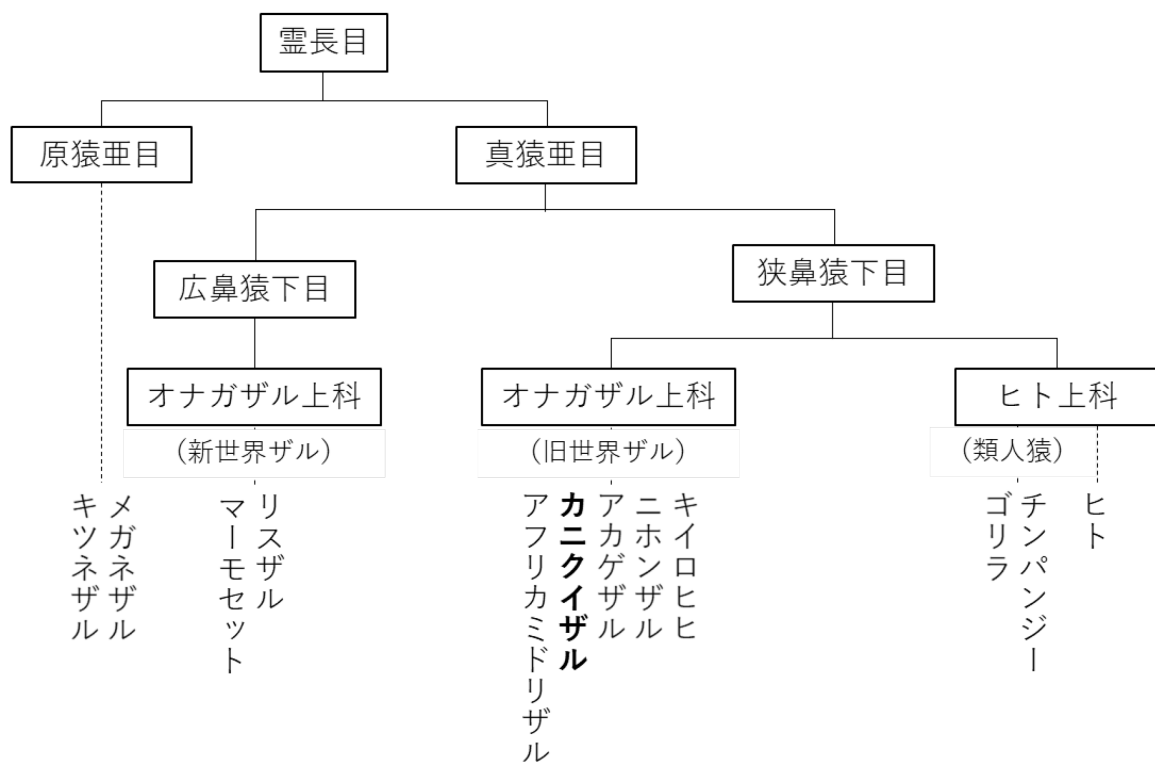


Fig. 1 霊長目の分類の概略と主要な種名 [Yoshida, T. and Fujimoto, K. 医科学研究資源としてのカニクイザル, 2006.より改変]

第2章

循環器疾患診断のための血液検査基準値に関する研究

第1節 はじめに

血液検査のうち、最も古く、かつ現在でも頻繁に用いられている検査が全血球計算（血算）である。血算とはすなわち、血液中に存在する赤血球、白血球、血小板などの細胞成分と血漿を分析することで、感染や貧血、腫瘍性疾患などを診断する検査法である。血算は非常に基礎的な検査であり、数日から数ヶ月の病態を反映することから一般的に実施されることが多く、その有用性は高い。

一方で、血液ガス測定のうち動脈血液ガスは、1950年代、ポリオの大流行の最中にあつたドイツのコペンハーゲンにおいて研究された。当時呼気中の気体には二酸化炭素が多く含まれ、吸気中の気体には酸素が多いことが発見された。同時期に化学分野においては「燃焼」反応が酸素と物質が反応し、二酸化炭素が生成される現象であることが発見された。同様の燃焼反応が人体でも行われることがわかり、さらにこの生体内での酸素運搬がヘモグロビンによることが判明し、肺や抹消細胞で酸素・二酸化炭素のガス交換機序が明らかとなった。

血液における呼吸生理学的研究とは別に、化学においても酸・塩基研究の視点から血液中の酸・塩基が研究され、生体の血液の酸塩基平衡が Henderson-Hasselbalch の式により記述されるようになっていった。この血液酸塩基平衡の研究によってこれら患者における「遊離アルカリ」欠乏状態、すなわち現代

でいう重炭酸喪失に伴う代謝性アシドーシス、糖尿病昏睡における有機酸の蓄積、すなわち糖尿病性ケトアシドーシスなど、病態を医学的に説明できるようになり、治療の突破口とされるようになった [4]。

このように、血液ガスは生体における様々な病態を即座に反映することから、手術中における判断や集中治療室における治療判断に用いられる。実験動物を用いた研究においても同様で、動脈血液ガスを用いて検討を行うことにより、様々な医学研究へと応用することが可能となると考えられる。

血液学データを含む様々な生理学的基礎データは動物種ごとに異なり、それはヒトと非ヒト霊長類の間でも同様である。先端医学研究をすすめるに当たり、その基礎データの欠如は大きな足かせとなると考えられる。実際、多くのカニクイザルなどのサル類を用いた研究において、基準となる値はヒトでの基準値を用いることが多く、さらなるサル類の研究発展のためにはこの基準値は重要と考えられる [2, 6]。

以上のことから、本章では特に実験用霊長類として頻繁に用いられるカニクイザルについて、実験用繁殖コロニーにおける幅広い年齢層の血算、動脈血液ガスについて解析を行い、基準値を作成し、加齢性の変化及び各年齢層、性別における変化についての検討を行った。

第2節 材料および方法

本研究では、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて飼育・繁殖されている健康なカニクイザル 62 頭を用いた (Table 1)。これらのサルは幅 50cm、奥行き 86cm、高さ 80cm の個別ケージ内で飼育され、飼育環境中の温度は夏場は $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、冬場は $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 50~60% で維持された。また、換気は毎時 12 回行われ、タイマーによる午前 7 時点灯、午後 7 時消灯の 12 時間照明が行われた。

さらに、これらの動物を既報に基づき、Immature Group (≤ 6 years old), Mature Group (7 - 25 years old), Senior Group (≥ 26 years old) の 3 群に分類し [16, 82, 110, 111]、加齢性の変化についても検討を行った。

血液サンプルの採取

血液サンプルはすべて塩酸ケタミン (10mg/kg, I. M., ケタラル®; 第一三共プロファーマ, 東京) 鎮静下にて仰臥位に保定し、大腿動脈より採取した。

得られた動脈血より 1ml を分取し、直ちにヘパリン処理を行い、オートアナライザー (RapidLab 348, Siemens, ドイツ) を用いて解析を行った。動脈血液ガスの検査項目は pH, Partial pressure of arterial CO_2 (PaCO_2), Partial pressure of arterial O_2 (PaO_2), Sodium ion (Na^+), Potassium ion

(K⁺), Chlorine (Cl), Calcium ion (Ca⁺⁺), Bicarbonate ion standard (HCO₃), Base excess in vitro (BE), Total carbon dioxide concentration (ctCO₂), Calculated Calcium ion with pH 7.4 (Ca⁺⁺(7.4)), Anion gap (AnGap), Saturation of arterial O₂ (SaO₂) の12項目を検討した。

また、残りの血液は直ちに EDTA 処理し、自動血球分析装置 (KX-21, Sysmex, 神戸) を用いて解析を行った。血算は白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、血小板数 (PLT) と、赤血球恒数のうち、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を検討した。また、赤血球のサイズのばらつきを表す赤血球容積分布幅 (RDW)、血小板のサイズを表す血小板容積分布幅 (PDW)、血小板項数である平均血小板容積 (MPV)、大型血小板比率 (P-LCR) についても検討した。

本研究は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験倫理委員会の承認を受け、米国実験動物資源協会 (ILAR) ならびに日本霊長類学会の定める非ヒト霊長類の実験的使用に関わるガイドラインに則り実施された[34, 35, 37]。

統計処理

得られた結果は年齢および性別について分析を行った。統計分析は性別間および年齢間の差については Student t 検定を行った。また、加齢性の変化につ

いては Pearson の積率相関係数を用いて相関を検討した。統計分析には MacTK version 2.0 analysis software (ESUMI, 東京)を用いた。すべての結果について、平均値および偏差を解析し、 p 値は 0.05 以下を有意差あり、0.01 以下を強い有意差ありとした。グラフデータには表計算ソフト (Microsoft Office Excel 2016; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を使用した。

Table 1 供試動物の体重及び年齢

	n	Weight (Kg) \pm SD	(Range)	Age (year) \pm SD	(Range)
Male	21	5.14 \pm 1.30	(2.78–7.58)	14.4 \pm 9.5	(3–32)
Female	41	3.54 \pm 1.10	(1.10–6.18)	17.8 \pm 8.7	(1–35)

第3節 結果

動脈血液ガス検査

動脈血液ガスに関する平均値および信頼区間を Table 2 に記した。PaCO₂ レベルはオスがメスより有意に高値 ($p < 0.01$) を示した。一方、PaO₂ レベルには性差は認められなかった (Table 3)。また、ctCO₂ レベルでもオスで有意な高値が認められた ($p < 0.05$) (Fig. 2)。

加齢性変化は PaCO₂, ctCO₂, HCO₃⁻, BE などで認められた (Table 4)。特に HCO₃⁻ および ctCO₂ は Immature 群とそれ以外の群とで有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。また BE は Immature 群と Mature 群との間に有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。PaCO₂ は低年齢では変化しなかったが、Senior 群において他群と比べて有意に増加した ($p < 0.01$) (Fig. 3)。

全血球計算

全血球計算に関する平均値および信頼区間を Table 5 に記した。なお、本研究においてはサルでの白血球百分比の機械的解析は判定が難しく、誤差が多かったため除外した。多くの数値は性差を認めなかったが、MCV および MCH はオスで有意な高値を認めた ($p < 0.05$) (Table 6)。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値は加齢性の増加を認めた (Table 7)。年齢群間の比較で

は、Senior 群において有意に赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の増加を認めた (Fig. 4)。

Table 2 カニクイザルにおける動脈血液ガスの基準値

	n	Mean	±SD	90% CI*
pH	59	7.40	0.06	7.39 - 7.41
PaCO ₂	59	36.77	4.67	35.77 - 37.77
PaO ₂	59	88.4	11.4	86.0 - 90.8
Na ⁺	59	148.14	3.22	147.45 - 148.83
K ⁺	59	3.72	0.42	3.63 - 3.81
Cl	34	107.97	2.25	107.34 - 108.61
Ca ⁺⁺	59	1.20	0.07	1.18 - 1.21
HCO ₃ ⁻	59	22.92	3.38	22.20 - 23.65
BE	59	-1.99	4.15	-2.88 - -1.10
ctCO ₂	59	23.47	3.99	22.61 - 24.32
Ca ⁺⁺ (7.4)	58	1.2	0.06	1.18 - 1.21
AnGap	32	16.22	3.59	15.18 - 17.27
SaO ₂	59	96.42	1.55	96.09 - 96.75

* 90% confidence interval; 90%信頼区間

Table 3 カニクイザル動脈血液ガスにおける性差

	Male				Female				<i>p</i>
	n	Mean	±SD	90% CI	n	Mean	±SD	90% CI	
pH	21	7.40	0.06	7.38 - 7.42	38	7.40	0.06	7.38 - 7.41	
PaCO ₂	21	38.91	3.23	37.70 - 40.13	38	35.58	4.95	34.22 - 36.93	**
PaO ₂	21	87.54	7.03	84.89 - 90.18	38	88.88	13.28	85.24 - 92.51	
Na ⁺	21	148.9	3.10	147.74 - 150.07	38	147.71	3.25	146.82 - 148.60	
K ⁺	21	3.84	0.34	3.71 - 3.97	38	3.65	0.45	3.53 - 3.78	
Cl	12	108.75	1.60	107.92 - 109.58	22	107.55	2.46	106.64 - 108.45	
Ca ⁺⁺	21	1.21	0.07	1.19 - 1.24	38	1.19	0.07	1.17 - 1.21	
HCO ₃ ⁻	21	24.08	3.67	22.70 - 25.46	38	22.28	3.07	21.44 - 23.12	
BE	21	-0.61	4.40	23.60 - 26.71	38	-2.74	3.85	-3.8 - -1.69	
ctCO ₂	21	25.16	4.13	23.60 - 26.71	38	22.53	3.64	21.53 - 23.53	*
Ca ⁺⁺ (7.4)	21	1.21	0.07	1.19 - 1.24	37	1.19	0.06	1.17 - 1.21	
AnGap	12	15.92	2.86	14.43 - 17.40	20	16.41	4.02	14.85 - 17.96	
SaO ₂	21	96.58	0.77	96.29 - 96.87	38	96.34	1.85	95.83 - 96.84	

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

Table 4 カニクイザル動脈血液ガスにおける加齢性変化

	unit	Immature		Mature		Senior		Immature vs Mature		<i>r</i>
		Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mature	Senior	
pH		7.37	0.06	7.4	0.06	7.39	0.06			0.05
PaCO ₂	mmHg	34.98	4.80	36.53	5.58	39.43	2.13	*	*	0.28
PaO ₂	mmHg	93.64	7.55	84.61	14.2	88.80	8.87			-0.2
Na ⁺	mmol/L	147	2.55	148.45	2.93	147.78	3.49			0.05
K ⁺	mmol/L	3.63	0.56	3.78	0.36	3.84	0.45			0.13
Cl	mmol/L	109.25	1.89	107.92	2.54	106.33	2.50			-0.37
Ca ⁺⁺	mmol/L	1.21	0.06	1.20	0.05	1.21	0.08			0.04
HCO ₃ ⁻	mmol/L	20.63	2.28	22.89	3.03	23.74	3.66	*	*	0.18
BE	mmol/L	-4.77	2.95	-1.99	3.73	-1.00	4.42	*		0.18
ctCO ₂	mmol/L	20.77	2.82	23.35	3.65	24.97	4.00	*	*	0.23
Ca ⁺⁺ (7.4)	mmol/L	1.19	0.07	1.20	0.05	1.20	0.06			0.08
AnGap	mmol/L	16.8	3.39	17.28	3.00	16.45	3.49			0.14
SaO ₂	%	96.86	0.87	95.76	2.31	96.60	0.83			-0.22

* $p < 0.05$

Table 5 カニクイザルにおける血算値および信頼区間

		n	Mean	±SD	90% CI
CBC	WBC	62	83.82	28.2	77.93 - 89.71
	RBC	62	637.24	91.06	618.22 - 656.26
	HGB	62	12.48	1.65	12.13 - 12.82
	HCT	62	43.08	5.33	41.97 - 44.19
	MCV	62	67.95	4.49	67.01 - 68.89
	MCH	62	19.70	1.87	19.31 - 20.09
	MCHC	62	28.97	1.68	28.62 - 29.32
	PLT	62	31.81	9.34	29.86 - 33.76
RBC	RDW*	62	32.24	9.83	30.19 - 34.30
PLT	PDW**	60	11.73	2.25	11.25 - 12.21
	MPV ⁺	60	9.78	1.18	9.53 - 10.03
	P-LCR ⁺⁺	60	23.64	9.50	21.62 - 25.66

* Red blood cell distribution width; 赤血球容積分布幅

** Platelet cell distribution width; 血小板容積分布幅

+ Mean platelet cell volume; 平均血小板容積

++ Large platelet cell ratio; 大型血小板比率

Table 6 カニクイザル血算値における性差

	Male				Female				<i>p</i>	
	n	Mean	±SD	90% CI	n	Mean	±SD	90% CI		
CBC	WBC	21	82.52	29.93	71.26 - 93.79	41	84.49	27.64	77.22 - 91.76	
	RBC	21	613.95	85.35	581.83 - 646.08	41	649.17	92.59	624.82 - 673.52	
	HGB	21	12.46	1.49	11.90 - 13.02	41	12.49	1.74	12.03 - 12.95	
	HCT	21	42.59	5.17	40.64 - 44.54	41	43.33	5.45	41.90 - 44.77	
	MCV	21	69.76	5.21	67.80 - 71.72	41	67.02	3.81	66.02 - 68.02	*
	MCH	21	20.43	1.75	19.77 - 21.09	41	19.32	1.83	18.84 - 19.81	*
	MCHC	21	29.30	1.22	28.84 - 29.76	41	28.80	1.86	28.32 - 29.29	
	PLT	21	31.10	11.16	26.91 - 35.30	41	32.17	8.39	29.96 - 34.37	
RBC	RDW	21	32.72	4.91	30.87 - 34.57	41	33.70	4.47	32.53 - 34.88	
	PDW	20	11.63	2.89	10.51 - 12.74	40	11.78	1.89	11.28 - 12.28	
PLT	MPV	20	9.68	1.32	9.17 - 10.19	40	9.83	1.12	9.53 - 10.13	
	P-LCR	20	22.62	10.81	18.44 - 26.80	40	24.15	8.88	21.78 - 26.52	

* $p < 0.05$

Table 7 カニクイザル血算値における加齢性変化

	unit	Immature		Mature		Senior		Immature vs		Mature	<i>r</i>
		Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mature	Senior	Senior	
	WBC	×10 ³ /μL	93.22	27.21	83.30	29.75	77.60	21.70			-0.06
	RBC	×10 ⁴ /μL	595.56	72.13	630.16	92.85	705.2	65.09	**	**	0.5
	HGB	g/dL	11.58	0.95	12.42	1.68	13.53	1.53	**		0.49
CBC	HCT	%	39.88	3.55	42.83	5.23	47.06	5.03	**	*	0.53
	MCV	fL	67.28	4.27	68.36	4.6	66.77	4.33			-0.12
	MCH	pg	19.56	1.51	19.84	1.96	19.22	1.79			-0.1
	MCHC	g/dL	29.07	1.15	29	1.89	28.76	1.04			-0.02
	PLT	×10 ⁴ /μL	33.49	7.55	31.87	8.58	30.02	13.82			0.04
RBC	RDW	fL	31.57	7.57	33.31	4.05	35.25	3.05			0.28
	PDW	fL	11.15	1.62	11.71	2.33	12.26	2.39			0.08
PLT	MPV	fL	9.51	0.69	9.80	1.27	9.91	1.16			0.04
	P-LCR	%	21.24	5.93	23.81	10.10	24.84	9.66			0.05

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

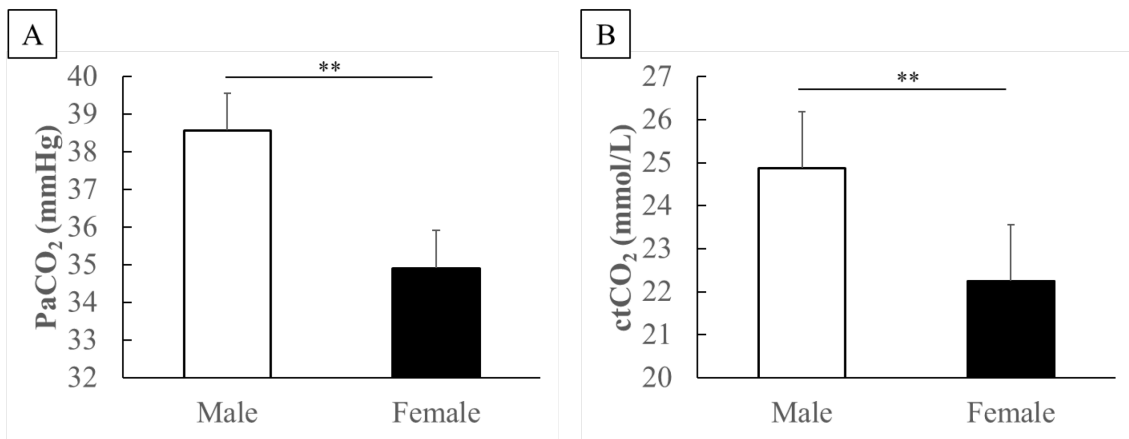


Fig. 2 動脈血液ガスにおける性差

PaCO₂ [A] および ctCO₂[B]など、活動量や筋肉量に關係すると考えられる血液中 CO₂量はオスで高い値を示した (** $p < 0.01$)

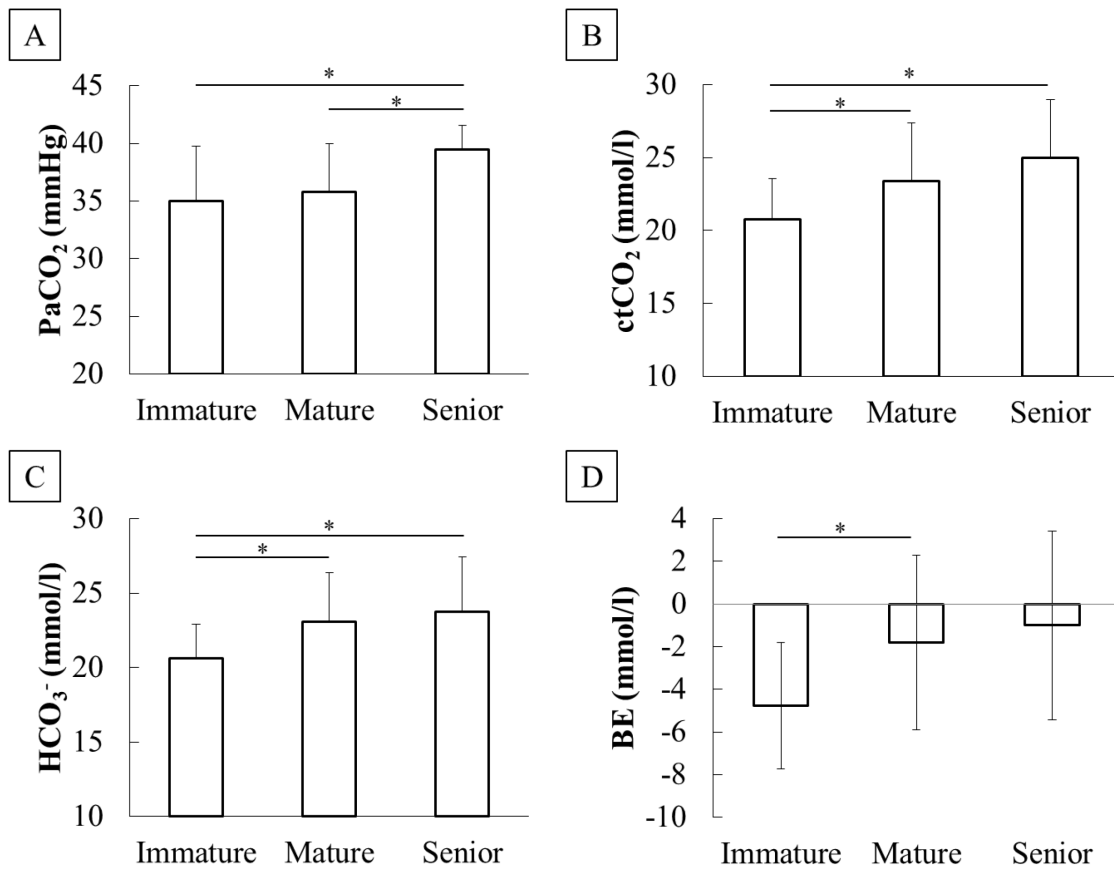


Fig. 3 動脈血液ガスにおける加齢性変化

PaCO₂ [A] および ctCO₂[B] など、CO₂ に関連する項目は加齢に伴った増加を示した。それに対応して、重炭酸イオンの増加[C]やベースエクセスの上昇[D]が認められ、重炭酸系による代償が行われていることが示された (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

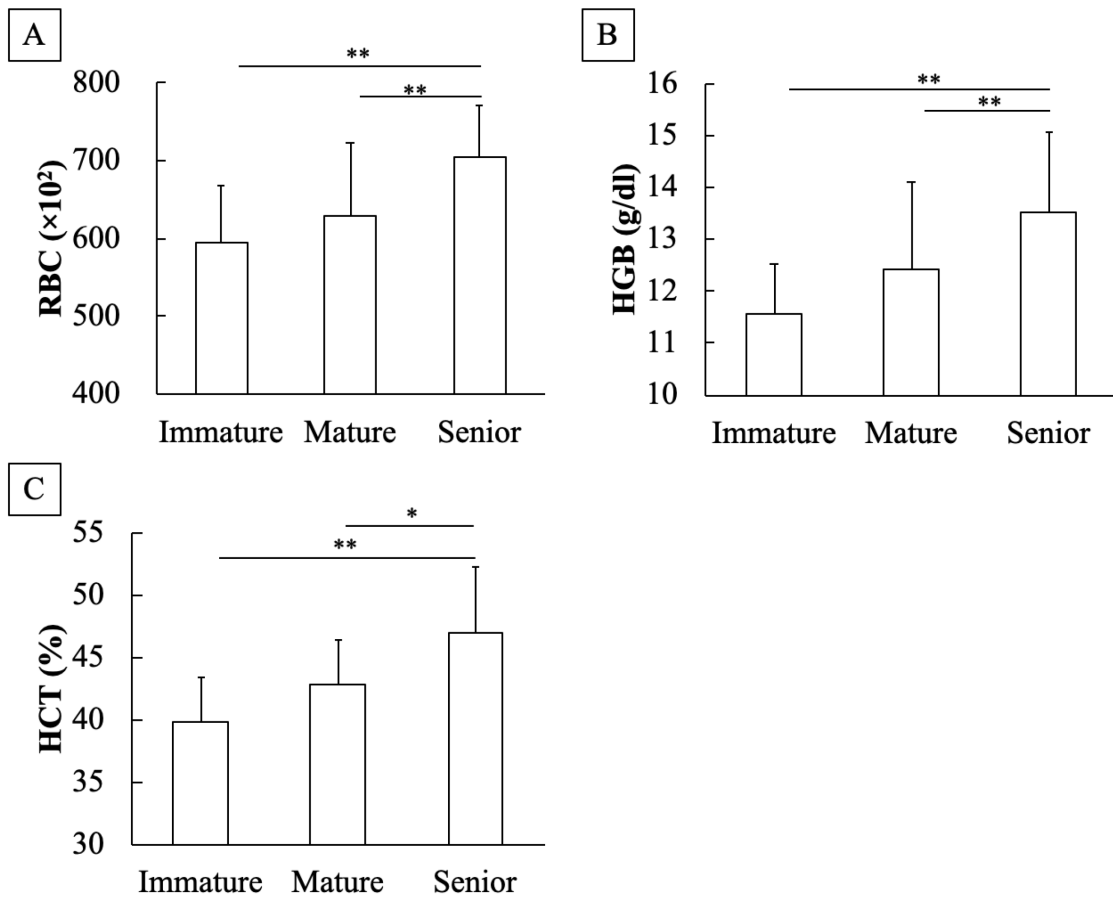


Fig. 4 カニクイザル血算値における加齢性変化
 赤血球数[A]ならびにヘモグロビン濃度[B]、ヘマトクリット値[C]は加齢性に増加した
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

第4節 考察

本研究はカニクイザルの動脈血液ガスにおける加齢性変化などを明らかにした初の報告である。これまでに、いくつかの血液ガスに関する報告はマカクザルに関して行われていたが、いずれも静脈血液ガスが対象であった[59]。動脈血液ガスは麻酔や外科的処置における重要なモニタリング項目であり、Animal welfare の観点には不可欠な項目である。また、血算における基準値報告はカニクイザルや他のサル類においても数例報告されていたが、いずれも小規模コロニーにおける報告であった[15, 20, 33]。本報では若齢から高齢に渡る非常に広い年齢帯での結果を得ており、様々な実験系に有効な基準値となると考えられる。

動脈血液ガス

動脈血液ガスにおいて、多くの項目で性差は認められなかった (Table 3)。性差が認められたのは PaCO_2 および ctCO_2 のみであり、いずれもオスで有意に高い値を示した (Fig. 2)。こうした酸素化傾向の違いはヒトや他の動物種でも認められている[78, 94]。本研究群はすべて定期的な健康診断を実施しており、異常のない個体を使用していることから、呼吸性疾患などの潜在性疾患が影響した可能性は低いと考えられる。また、加齢性の変化について検討したところ、身体が急激に増大する性成熟期にかけて急激な CO_2 排出の増加が認められ、その後は緩やかな増加を示した。一方で体重とも相関傾向が認められ、筋肉重量との関係が示唆された (Fig. 5)。先行研究ではベースエクセスはアカゲザルではヒトと比べて低い値を示すという報告がなされているが[59]、本研究においてもメスでは -3.09mmol/L と低い値を示していた。一方で、アカゲザ

ルではヒトに比べ高い pH 値が報告されていたが (7.45 ± 0.04)、本研究におけるカニクイザル pH はヒトにより近い値 (7.40 ± 0.06) を示した [59]。また、 PaCO_2 はヒトに比べ定値を示し、 PaO_2 はヒトに近い値が認められた [51]。この PaCO_2 の値はアカゲザルと近い値を示しており、マカク属で一般的な数値であることが示唆された。

CO_2 の排出に関与している PaCO_2 、 ctCO_2 およびその緩衝系である HCO_3^- は加齢性に低下した [49, 78] (Fig. 3)。この値はヒトの血液ガスにおける生理的変動範囲での変化だった。Sodium ion および Potassium ion はヒトやアカゲザルと比べても高い値を示した。また、Chloride ion はアカゲザルに比べわずかに高い値を示した [51, 59]。Sodium ion はアカゲザルでもヒトに比べ高い値を示していることから、マカク属サル類の傾向であることが示唆された。

Chloride ion は本実験群が野生個体と異なり、栄養コントロール下にあるというバイアスが存在することから、こうした塩分摂取等の影響も考慮しなければならない。この点については今後も検討を続ける必要があるだろう。

しかしながら、Sodium ion や Chloride ion の値はヒトに比べやや高く、アカゲザルと非常に近い値を示していたことから、マカク属サル類の特徴であると考えられた。Calcium ion はアカゲザルに比べ高い値を示した。Anion gap はアカゲザル (17.21 ± 4.53 mmol/L) に比べるとやや低い値を示した (16.22 ± 3.59 mmol/L) が、ヒト (12 ± 2 mmol/L) に比べると高い値であった。 HCO_3^- は過去のアカゲザルの報告やヒトの基準値と比べ近い値を示していた。このことから、マカク属サル類においては高レベルの Sodium ion が Anion gap を上昇させていたことがわかる。こうした高ナトリウム血症は脱水やアルドステロン症、クッシング症候群など様々な背景が示唆されるが本実験群においてもこれらの臨床的所見は認められなかったことから、ヒトに比べて高い Sodium ion

値はマカク属サル類の生理的基準値であることが示唆された。また、メスで認められた高い Anion gap は HCO_3^- の低値によるものと考えられる。これは雌雄による筋肉量や活動量の違いによる CO_2 排出量とそれに伴う血液の酸性化と関係すると考えられるが、本研究では 62 頭と制限されたコロニーでの検討であることから、今後もさらに例数を増やしていくことがこれを確認するために重要であると考えられる。

全血球計算

カニクイザル血算における以前の報告と比較しても赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、赤血球恒数は同様の値を示した [83] (Table 5)。

本研究においては赤血球数およびヘモグロビン、ヘマトクリット値がオスに比べてメスでやや高い値を示した (Table 6)。一般に、メスでは性周期および月経出血によりこうした値が低いとされる [51, 83]。本研究で認められたメスにおける高値は年齢分布の偏りなどが影響している可能性が示唆される。加齢に従い、赤血球表面の酸素運搬能力などは低下することが知られており、それに伴い赤血球比率は増加するとされている。本研究群は繁殖コロニーであることから、オスが若く、メスがより高齢である群構成となっている。こうしたことから、メスにおける赤血球数の高値は年齢のバイアスによる可能性が示唆される。

MCV および MCH はヒトの報告に比べ低い値を示した。アカゲザルにおける報告もヒトに比べて低い赤血球恒数を示すことから、マカク属全般的に赤血球恒数はヒトに比べ低い値を示すことが示唆された [83, 86, 87]。また、加齢性に赤血球色素は沈着するとされるが、本研究においても前述の通り加齢性にこ

これらのパラメーターは増加を示しており、その他のサル類と同様の結果を示すことが確認された[102]。

全血球計算と動脈血液ガス検査の関係性

動脈血液ガスおよび全血球計算は加齢、脱水、炎症などの様々な全身性病態および循環動態や肺機能と関連している[28, 84]。O₂は赤血球によって血管中を輸送されるが、O₂の血中濃度の低下は腎臓におけるエリスロポエチンの分泌増加などの生理的活動をコントロールしている。本研究において、O₂に加齢性の変化は認められなかった。しかしながら、ヘマトクリット値やヘモグロビン濃度、赤血球数は加齢性に増加した (Fig. 4)。既報においても赤血球数などの増加は高齢のマカク属サルにおいて認められており[20, 36, 84]、SaO₂を維持するための生理的機構である可能性が示唆された。一方で、CO₂は赤血球に比べ血漿中に多く溶解し、輸送される。カニクイザルの心機能は加齢性に低下することが報告されており[42]、CO₂の排泄能も循環機能の低下に伴い、PaCO₂などは増加した (Fig. 3)。

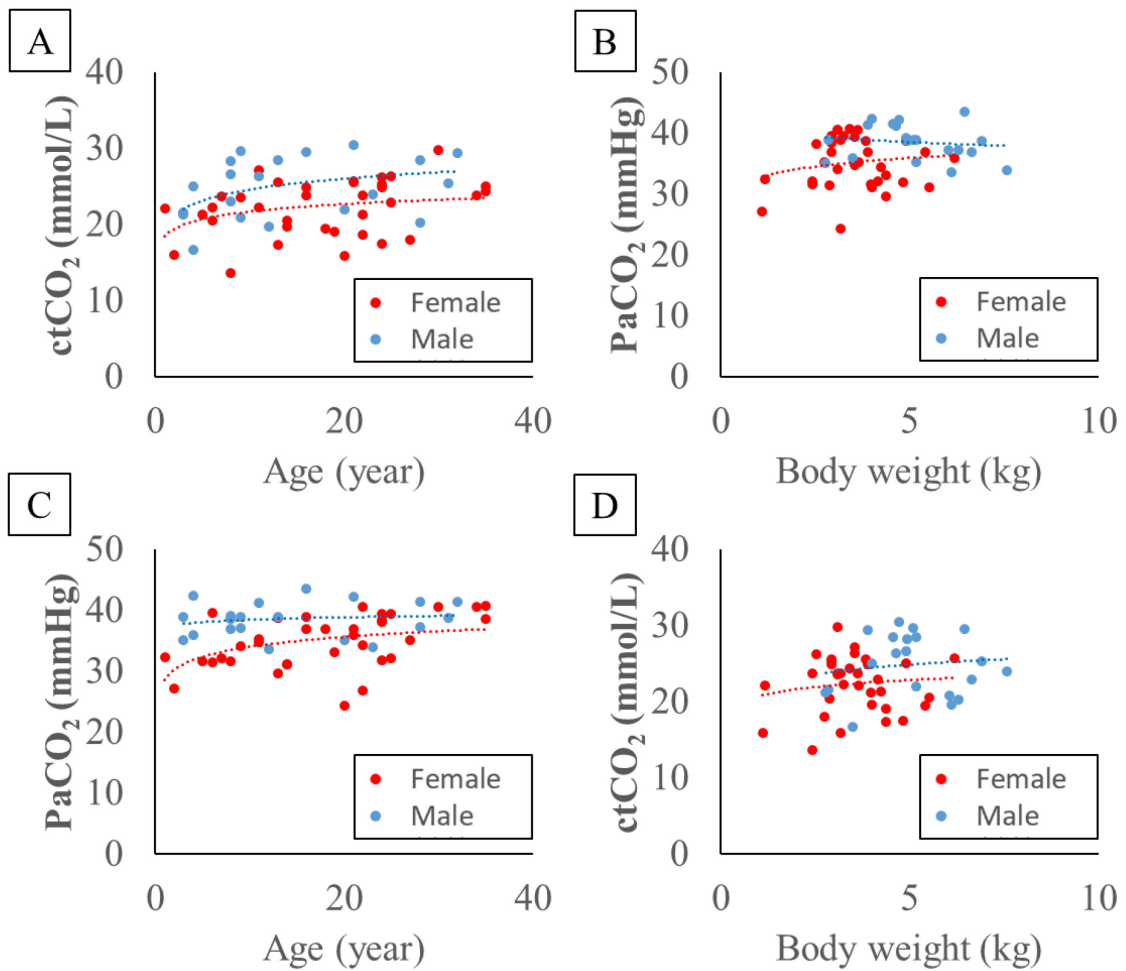


Fig. 5 CO₂排出を反映する2項目における加齢性および体重との相関
 CO₂量は性成熟まで急激に上昇し、その後は緩やかな増加を示した ([A], [C])。一方
 で体重が増加するのに相関してCO₂量は増加し、筋肉重量との関連性が示唆された
 ([B], [D])。

第5節 小括

以上の結果より、本章ではカニクイザル繁殖コロニーにおける動脈血液ガスおよび全血球計算の基準値を確立した。

本実験群は多くの先端医学研究に用いられており、確立された基準値はこれらの基盤となるだけでなく、国内外の霊長類を用いた医学研究において非常に有用な結果をもたらすと思われる。また、老化に伴う値の変動は老年医学の発展に寄与し、得られた多くの値は実験動物の獣医学的ケアならびに動物群の維持管理に有用なデータとなると思われる。

第3章

正常心電図およびQT補正式に関する研究

第1節 はじめに

今日では一般に臨床に多く用いられている心電図であるが、創薬研究においても重要な位置を占めている。様々な医薬品もしくは化学物質の中には心臓の刺激伝導系ならびに心筋細胞の電氣的活動を変調させる作用を持つものが存在する。1990年から2004年までの間に発売後、市場から撤退を余儀なくされた薬品34種のうち、心電図に影響をおよぼすことがわかったものは14種と1/3以上を占めていた。そのうち直接的に刺激伝導系もしくは心筋細胞活動電位に影響を及ぼすものだけでも10種と非常に多いことから創薬研究における心電図検査の重要性が伺える[99]。

こうした薬物による副作用の研究は大きく分けて次の4つのステージに分けられている。すなわち①「創薬のSeedsの探索」、「その作用などを発見する基礎研究」、②「標的を発見し、それに対する構造の最適化」、「動物実験などにより安全性の検証や薬物動態などを判断する非臨床試験」、③「実際のヒトを対象として有効性や安全性を確認する臨床試験」、④「承認後に販売された薬品の販売後調査・試験」である[74]。

ヒトを対象とした臨床試験において、副作用などが認められた場合、薬品はそれ以降の開発を行うことはできない。したがって創薬研究においては、その前段階である非臨床試験段階までにその薬物動態を明らかにすることが必要である[109]。

このため、実験動物を用いた検討は非常に重要である。なかでも最も用いられている実験動物はマウス(*Mus musculus*)であり、ついでラット(*Rattus norvegicus*)、ウサギ(*Oryctolagus cuniculus*)やモルモット(*Cavia porcellus*)が続く。しかし近年、これらの小型実験動物とヒトなどの大型哺乳

乳類との間では、心筋細胞の活動電位を引き起こすチャネルの割合が異なることが報告された。よって大型実験動物を用いた非臨床試験の重要性が再確認された。[18, 19, 54]

これは心筋の再分極時に開口する K^+ チャネルの一部で、ヒトなどでは主体となるチャネルが I_{Ks} や I_{Tr} などの遅延整流性チャネルであるのに対し、マウスなどでは一過性外向き電流である I_{to} が主体となることがわかった。非臨床試験においては、ヒトへの影響を詳細に検討する必要があることから、こうした薬物動態を忠実に反映する実験動物の確立が望まれている[55, 88, 90]。

心電図では Q 波開始から T 波終了までの時間を QT 間隔とよび、心筋における静止膜電位の再分極を反映することが知られている (Fig. 6)。一方で、この QT 間隔は心拍数が速くなるほど比例して短くなることが知られており、単純な比較ができないことから心拍数に影響されない補正した数値を用いる。この数値は補正 QT 間隔とよばれ、Bazett や Friedericia、Yoshinaga など様々な式が提唱されている。

一般にヒトの成人では Bazett 式が用いられ、心拍の速い小児では Friedericia の式が用いられてきた。一方で、カニクイザルにおいては Bazett 式が経験上用いられていたものの、詳細な検討を行った報告はなかった。

サル類はヒトを含む霊長目に属し、中でもカニクイザルはチンパンジーなどの類人猿についてヒトとの遺伝的距離が近い。そのことから様々な生理学的・解剖学的構造がヒトに類似しており、先端医科学研究・創薬研究において重要な動物である[31, 43]。

一方で、サル類における心電図の報告は限られており、群としてのサルを検討した研究は少ない[38, 41, 52, 62, 63, 64, 65, 105]。本研究ではヒト前

臨床モデルとして有用なカニクイザルにおける心電図基準値の確立ならびに補正 QT 間隔を導く補正式を検討した。

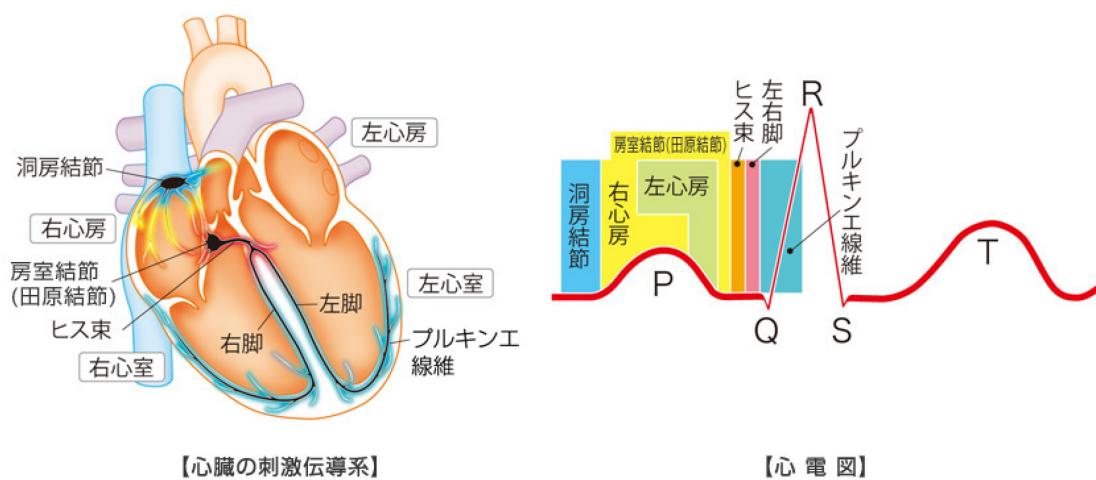


Fig. 6 刺激伝導系と心電図波形が示す刺激伝導系の対応部位

房室結節において遅延された電位は右脚左脚を介してプルキンエ線維へと拡がる。Q波からT波は心室筋の電位に相当し、心筋細胞ごとの第3相（プラトー相）を反映している [五島雄一郎ら，心電図のABC（日本医師会編），1993，より引用]。

第2節 材料および方法

本研究では、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて飼育・繁殖されている健康なカニクイザル 353 頭を用いた (Table 8)。これらのサルは幅 50cm、奥行き 86cm、高さ 80cm の個別ケージ内で飼育され、飼育環境中の温度は夏場は $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、冬場は $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 50~60% で維持された。また、換気は毎時 12 回行われ、タイマーによる午前 7 時点灯、午後 7 時消灯の 12 時間照明が行われた。

本研究は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験倫理委員会の承認を受け、米国実験動物資源協会 (ILAR) ならびに日本霊長類学会の定める非ヒト霊長類の実験的使用に関わるガイドラインに則り実施された [34, 35, 37]。

心電図測定

心電図測定には心電計 (カーディサニー D300, フクダエム・イー工業, 東京 および Cardiofax V ECG-9392, 日本光電工業, 東京) を用いた。すべての測定は塩酸ケタミン (10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファーマ, 東京) 鎮静下で実施された。動物は仰臥位に保定し、右前肢根部、左前肢根部、左後肢根部にリードを設置し、右後肢根部にアースを設置した。各リードより仰臥位標準肢誘導における 6 誘導心電図を測定し、各波形について 5 波形を平均し値とした。特に RR 間隔および QT 間隔については手動で計測を行い、5 波形の平均値を求めた。T 波が明らかでない場合は結果の除去を行った。

QT 間隔補正式

QT 間隔は一般的には心電計による自動計測をもちいて求められる。また、QT 間隔は心拍数や RR 間隔に影響されるため、補正式を用いるのが一般的である。しかしながら、サル的心拍数はヒトに比べて速く、ヒト用の心電計を用いて補正ができるかについては検討が行われていなかった。本研究ではヒト臨床において一般的に用いられるいくつかの QT 補正式[7, 14, 61]を用いて検討を行った。

まず、QT 間隔および RR 間隔について手動で計測を行った。次に得られた QT 間隔を既存の QT 補正式を用いて補正した。補正に用いた計算式は Bazett 式 ($[QTc] = [QT]/[RR]^{1/2}$)、Fridericia 式 ($[QTc] = [QT]/[RR]^{1/3}$)、Framingham 式 ($[QTc] = [QT] + (1 - [RR] * 0.154)$)、Hodges 式 ($[QTc] = [QT] + 1.75 * ([heart\ rate] - 60)$)、Yoshinaga 式 ($[QTc] = [QT]/[RR]^{0.31}$) である[Luo et al. 2004]。

次に Bazett 式、Fridericia 式、Yoshinaga 式に共通する式をもとに実験群における理想的な QT 補正式を検討した。

最後に得られた補正 QT 間隔について、ヒトの臨床基準値である 405ms 以上について精査した。

統計解析

統計には各 QT 間隔および心電図項目には性別に関して両側 Welch t 検定を実施した。QT 間隔および補正 QT 間隔については年齢および体重との相関を Pearson の積率相関係数を用いた。p 値は 0.05 以下を有意差ありとした。統計分析には R (ver. 3.3.2, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) および R commander (ver. 2.3-0) を改変した EZR (自治医

科大学附属さいたま医療センター，埼玉) を用いた[49]。グラフデータには表計算ソフト (Microsoft Office Excel 2016; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を使用した。

Table 8. 供試動物の体重及び年齢

		Female (n=191)	Male (n=162)	Total (n=353)
Weight (kg)	Mean \pm SD	3.8 \pm 1.2	4.7 \pm 1.6	4.2 \pm 1.5
	Range	1.2 - 8.1	1.4 - 10.0	1.2 - 10.0
Age (years)	Mean \pm SD	16.1 \pm 9.0	9.7 \pm 8.0	13.1 \pm 9.2
	Range	1.2 - 36.4	1.3 - 33.1	1.2 - 36.4

第3節 結果

I誘導からIII誘導までのECGをTable 9に記した。各項目において雌雄間に有意差は認められなかった。Fig. 7にカニクイザルにおける正常および異常心電図を示した。カニクイザルの正常心電図 (Fig. 7A) はヒトの心電図に近似しており、異常心電図 (Fig. 7B) においてはQT延長やR波の低電位などの異常が認められた。各波間隔もヒトに比べ短く、波形はヒトと近い値を示した。多くのサルではR波において最も高電位を示したのはII誘導であり、平均前胸額面電気軸はヒトに近似していた。

一般的にカニクイザルのQRS群は健康であってもヒトと比べ低電位とされる[48, 103]。ホルター心電計を用いて得られたR波などの多くのパラメータはヒトの心電図と比較すると低電位であった (Fig. 8)。さらにスナップショットのケタミン鎮静下心電図でも同様の結果を示した。ケタミンは心拍数を増加させることが知られているが、既報においてもサルではケタミンによる心電図への影響はほとんどないとされている[48, 103]。このことはケタミン鎮静下におけるスナップショットの心電図測定は基礎疾患を発見するために有用性が高いと考えられる。

Bazett式は長い間QT間隔の補正に用いられてきた。しかしながら、既報におけるサルの心電図報告は毒性試験に用いられる若いサルのみであり、高齢個体における報告などはなかった。本研究では広い年齢層に対応したサル用のQT補正式を確立することを目指した。

QT間隔の補正に用いた6つの補正式のうち、Bazett式は比較的RR間隔の影響を受けない結果を示した。本章ではこのBazett式をもとにさらにサルに適応した補正式を求めた。

Bazett 式は $[QTc] = [QT]/[RR]^n$ によって求められ、べき指数は $n=1/2$ が用いられている。このべき指数を RR 間隔をもとに補正を行った。カニクイザル大規模実験群において RR 間隔と QT 間隔の相関係数より得られたべき指数は「0.576」であり、このべき指数を用いて新規補正式とした (Fig. 9)。各補正式を用いて求められた QT 間隔および RR 間隔の相関を Fig. 10 に示した。

本補正式は高齢サルにおいても非常に良好な補正を示しており、RR 間隔に影響されない一定した QT 間隔を示した (Table 10)。また、本補正式を用いた補正 QT 間隔において性差は認められなかった (Fig. 11A)。さらに年齢や体重に比例した QT 延長も認めなかった (Fig. 11BC)。新規 QT 補正式を用いた補正 QT 間隔は $373 \pm 31\text{ms}$ であった。また、この補正式を用いた QT 間隔の分布はヒトの分布と同様であった (Fig. 11A)。さらに本補正式を用いヒトの QT 間隔基準値をもとに 405ms 以上の QT 間隔を示した個体に関し精査を行ったところ、拡張型心筋症や糖尿病、心臓弁膜症などの基礎疾患が存在した (Table 11)。また、病理組織学的検索を併用した解析においては最も多い疾患は拡張型心筋症や 2 型糖尿病であった (Fig. 11D, Fig. 12)。

Table 9. カニクイザルにおける心電図基準値

		心拍数 (回/分)	PR 間隔 (ms)	P 幅 (ms)	P 振幅 (mV)	QRS 幅 (ms)	電気軸 (度)	QT 間隔 (ms)	QTc 間隔 (ms)	平均 R 波電位 (mV)
All	AVERAGE	164	87.08	47.90	0.10	33.50	62.8	208.80	226.20	0.80
	STDEV	29	16.70	21.70	0.10	11.80	41.5	28.90	21.40	0.40
	Min	73	49.00	24.00	0.00	9.00	-77.0	155.00	179.00	0.00
	Max	233	171.00	197.00	1.00	91.00	270.0	314.0	303.0	2.60
Female	AVERAGE	171	86.37	47.76	0.11	33.04	57.8	202.23	222.23	0.81
	STDEV	26	16.96	19.18	0.09	10.44	35.2	24.29	19.45	0.39
	Min	110	61.00	24.00	0.00	16.00	-65.0	155.00	180.00	0.00
	Max	230	171.00	160.00	0.98	63.00	149.0	294.00	303.00	2.56
Male	AVERAGE	156	89.42	48.05	0.12	34.08	68.8	216.58	230.98	0.75
	STDEV	31	16.08	24.39	0.11	13.20	47.1	31.71	22.56	0.40
	Min	73	49.00	27.00	0.02	9.00	-77.0	157.00	179.00	0.01
	Max	233	171.00	197.00	1.02	91.00	270.0	314.00	301.00	2.03

Table 10 353 頭のカニクイザルにおける各種 QT 補正式を用いた QT 間隔 (QTc)

	Female	Male	Total	Correlation with RR interval	Correlation with age	P- value
QTc ^{0.576} (ms)	371±31	375±32	373±31	-0.07+	0.01	
QTcB (ms)	342±29	348±29	345±29	0.09+	0	
QTcF (ms)	288±26	297±27	292±27	0.41	-0.02	**
QTcFr (ms)	310±21	306±19	303±21	0.48	-0.03	***
QTcH (ms)	176±51	188±45	197±45	-0.97	0.05	***
QTcY (ms)	290±27	285±26	281±27	0.44	-0.03	**
Heart rate (bpm)	173±26	161±31	167±29	-0.97	0.05	***
RR (ms)	356±61	389±79	371±72	1.00	-0.07	***
QT (ms)	204±25	216±29	210±28	0.76	-0.05	***

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

QTcB; QTc with Bazett' s formula

QTcF; QTc with Fridericia' s formula

QTcFr; QTc with Framingham' s formula

QTcH; QTc with Hodges' s formula

QTcY; QTc with Yoshinaga' s formula

Table 11 補正 QT 間隔が 405ms 以上を示した個体における基礎疾患

	Over 405 ms	Over 440 ms
Normal	13	0
Other abnormalities	7	1
Family anomaly	6	1
Valvular disease	25	6
Fatty Heart	3	1
DCM*	5	3
Heart Failure	9	4
Arrhythmia	2	0
LBBB**	1	1
VSD ⁺	1	0
DCRV ⁺⁺	1	0
Diabetes	2	0
Total	75	17

*DCM; Dilated cardiomyopathy

**LBBB; Left bundle branch block

⁺VSD; Ventricular septal defect

⁺⁺DCRV; Dual chamber right ventricle

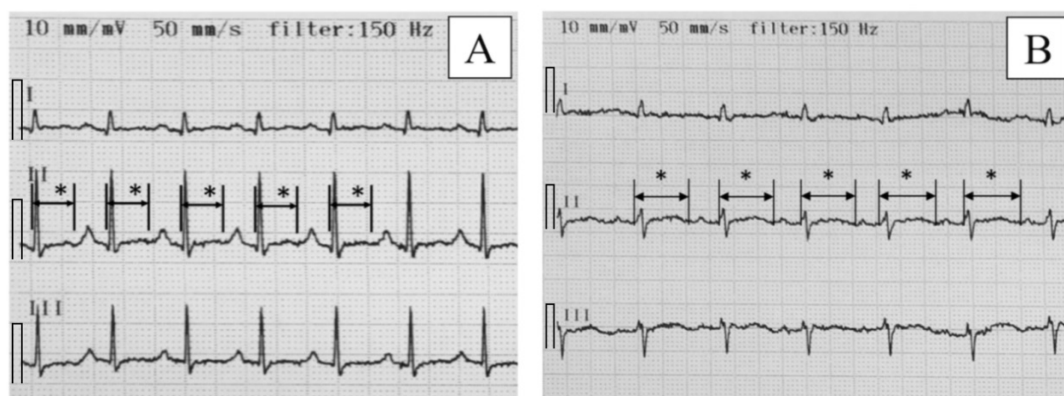


Fig. 7 カニクイザルにおける正常および異常心電図

[A]は正常心電図、[B]は異常心電図を示す。[A]で見られるQT間隔（*）が心疾患個体（[B]）においては延長していることが認められた。また、R波の低下や心拍数の変動なども認められた。



Fig. 8 ホルター心電計におけるカニクイザルの心電図

ケタミン不動化による循環器系への影響に関して、スナップショット心電図とホルター心電図を比較した。ホルター心電計を用いた心拍数変動平均値は鎮静下の心電図検査において得られた心拍数と大きな差異は認められなかった。

$$[QTc] = [QT]/[RR]^{0.576}$$

Fig. 9 カニクイザルにおける新規 QT 補正式

既存の集団補正法の基本式 $[QTc]=[QT]/[RR]^n$ を QT 間隔および RR 間隔の相関より補正した新規式は $[QTc]=[QT]/[RR]^{0.576}$ となった。

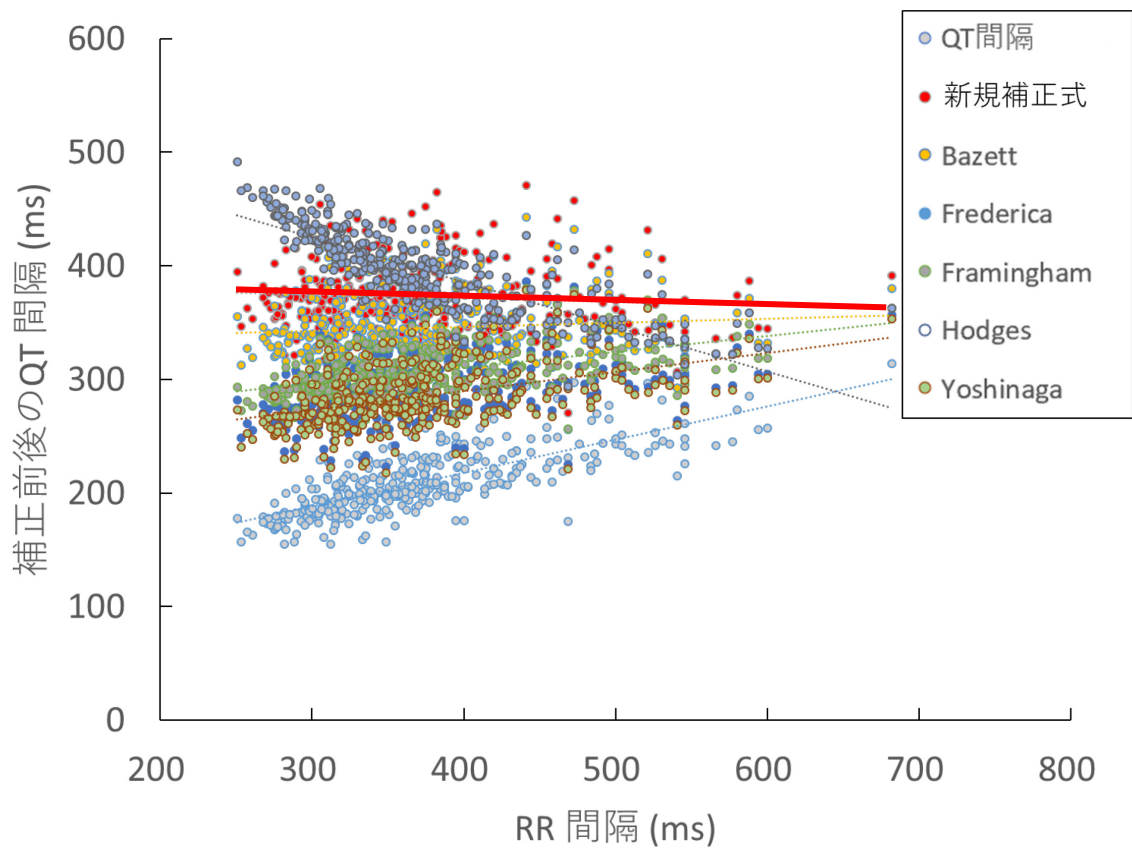


Fig. 10 既存のQT補正式および新規補正式を用いた補正QT間隔

既存の補正式と比較すると新規補正式を用いた補正QT間隔はほとんどRR間隔の影響を受けない良好な補正結果を示した。

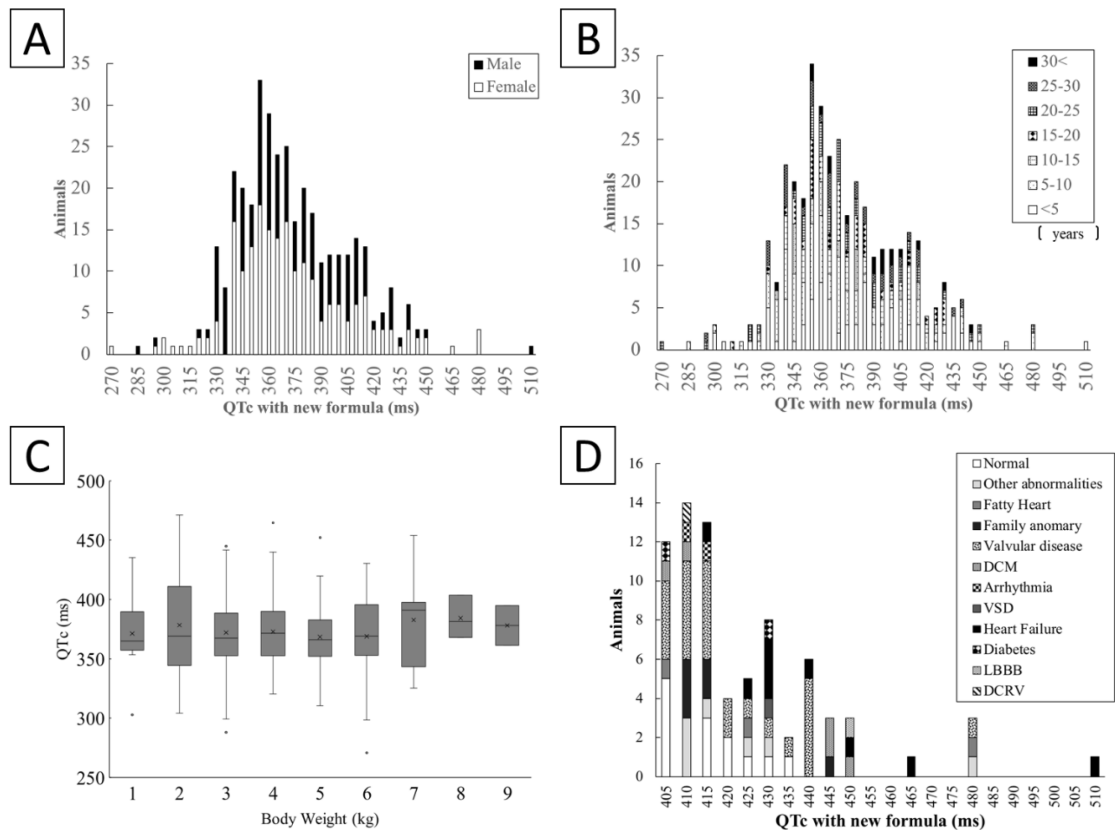


Fig. 11 新規QT補正式を用いた補正QT間隔(QTc)の分布および年齢、体重との関係ならびに基礎疾患罹患ザルの検出率

新規補正式を用いた検討では補正QT間隔の分布に性差は認められなかった([A])。また、年齢による分布も偏りは認められなかった([B], [C])。補正QT間隔をもとに基礎疾患を検討したところ、405ms以上に多くの基礎疾患罹患ザルが確認された([D])。DCM; Dilated cardiomyopathy, LBBB; Left bundle branch block, VSD; Ventricular septal defect, DCRV; Dual chamber right ventricle

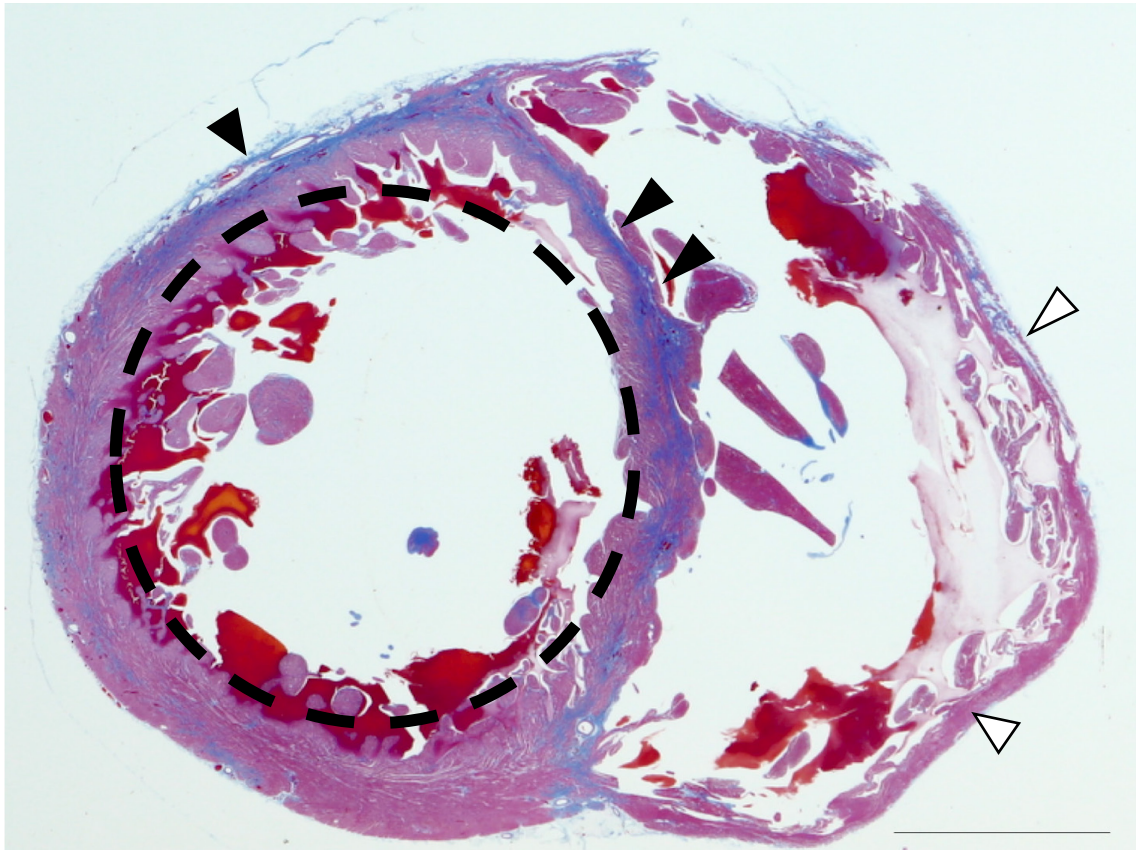


Fig. 12 補正 QT 間隔が 405ms 以上を示した個体における病理組織学的所見

補正 QT 間隔が基準以上であった個体（カニクイザル，15 歳令，メス）を組織学的に検討したところ、心室壁の線維化（黒矢頭）および菲薄化（白矢頭）、心室内腔の拡張（点線内）が認められる拡張型心筋症などの心疾患が認められた。

第4節 考察

カニクイザルにおける標準心電図

カニクイザルにおける心電図は以前にも数報報告されていたものの、それらは1歳から5歳までの若いサルにおけるものに限られていた[3, 5, 22, 95]。本研究によりカニクイザル大規模繁殖群における正常心電図が初めて明らかとなった。また、カニクイザルの鎮静下における心電図への影響を検討した初報告でもあり、薬理的、生理学的な研究への有用な知見となると考えられる。

本研究において、カニクイザルは塩酸ケタミン (10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファーマ, 東京) 鎮静下において心電図の計測を行った。非ヒト霊長類において、ケタミンを用いた鎮静は心電図や心拍数へ大きい影響がないことが報告されていることから[48, 58, 103]、鎮静下において心電図計測を行うことは非ヒト霊長類においては一般的な方法となっている[5, 95]。さまざまな基礎疾患を早期に発見することはサルにとって安全でストレスのない施設マネジメントに繋がり、様々な実験モデルを創出することにもつながってくるだろう[103]。

得られた心電図の各パラメータは年齢および体重との間に相関は認められなかった (Fig. 11B, C)。ヒトでは加齢性に PQ 間隔および P 波時間が加齢性に延長することが報告されている[7, 14, 61]。一方で、本研究では PQ 間隔および P 波時間に加齢性変化が認められなかったことから、カニクイザルにおいて

は加齢がこれらに関係しない可能性が示唆された。PQ 間隔および P 波時間は他のマカク属サル類においても報告がなく、本属サル類の加齢と PQ 間隔および P 波時間の特徴を検討するためには追加の研究が必要である。平均 R 波振幅はカニクイザルにおける以前の研究より高い値を示した。また、他の波形は既報と近い結果を示した[3, 5, 22, 25, 95]。しかしながら、こうした結果はサンプルサイズによるバイアスが無視できない一方、本研究では 300 頭以上というサンプルサイズにおける検討であり、定期健康診断において特徴的な疾患が確認されていない群での検討であることから信頼性は高いと考えられる。

カニクイザルの心拍数は（メス：173±26 bpm, オス：161±31 bpm）と本研究では既報より遅い結果を示した。また、P 波振幅や T 波振幅などの他のパラメータでは既報と似た結果を示していた[3, 5, 22, 25, 95]。本研究では仰臥位に保定した上で心電図を計測した。心拍数は測定姿勢によって影響を受けることが知られており、本研究では仰臥位での測定が影響した可能性が示唆される。実際、本研究での遅い心拍数は過去の仰臥位で計測された心拍数と近い結果を示していた[95]。

カニクイザルのための新規補正式

心電図を測定し、得ることのできる波形の振幅や伝導時間は様々な心疾患を検出するために有用な検査法である。ヒト医療においては QT 間隔の測定は特に心疾患の診断に重要な検査項目として知られている[60]。一方で、臨床や研

究においては QT 間隔は心拍数によって影響を受けるため、QT 間隔を補正した補正 QT 間隔が一般的に用いられる。Bazett 式 ($[QTc] = [QT]/[RR]^{1/2}$) および Fridericia 式 ($[QTc] = [QT]/[RR]^{1/3}$) は QT 補正式の中でも最も一般的に用いられる式である。Bazett 式は成人で、そして Fridericia 式は小児で用いられるが、これは小児の速い心拍数に対応するためべき指数を調整した式である。同様に、Yoshinaga や Hodges、Framingham 式なども同様に年齢や性別ごとに調整して用いられている。Yoshinaga 式は Bazett 式を Fridericia 式同様に小児に調整して作成した式であるが、これら Fridericia 式や Yoshinaga 式を用いる小児の心拍数を勘案してもカニクイザルの心拍数は速く、このような心拍数では補正 QT 間隔を過大評価してしまうことから創薬研究においては使用されてこなかった。また、Bazett 式は毒性試験においても一般的に用いられる方法ではあったが本研究のような老齢個体における報告はなかった。Hodge や Framingham 式はべき指数を利用した補正式に比べ、速い心拍数でも補正 QT 間隔を過大評価しない式とされていた[61]。しかしながら、本研究においてはこれらの式では QT 間隔を RR 間隔に対し、適切に補正することができなかった。本研究結果では、Bazett 式は補正 QT 間隔と RR 間隔の相関係数が 0.087 とほとんど無相関であり、実験用カニクイザルにおいて利用可能な補正式であると考えられた (Fig. 10)。

本研究では、既存式に比べカニクイザルにより適した理想的な式を求めるため、RR 間隔と QT 間隔の相関よりべき指数 (0.576) を算出した。このべき指数

を Bazett 式などの指数関数を利用した標準式 ($[QTc] = [QT]/[RR]^n$) に代入し、補正後の QT 間隔と RR 間隔の相関を検討したところ、相関係数は Bazett 式に比べより無相関な -0.075 であった。

Fig. 11A は性別ごとの補正 QT 間隔分布である。本研究においては補正 QT 間隔に性差は認められなかった。さらに年齢・体重に関しても相関は認められなかった (Fig. 11B, C)。ヒト医療においては男性で 430ms、女性で 440ms 以上を QT 延長症候群として診断し、予後不良であるとの報告がなされており、400ms 以上は正常ではあるものの時に異常を示す報告もなされていることから、405ms 以上に注目して精査を行ったところ、いくつかの基礎疾患を確認した。基礎疾患の確認には心電図測定後、補正 QT 間隔が 405ms 以上の個体に関して胸部レントゲン撮影、心臓ホルモン測定、心エコー図検査などの循環器特異的検査を実施した。結果、これらには循環器疾患及びその他の全身性疾患を持つ個体が認められた。さらに病理学的検索を実施した結果、補正 QT 間隔が 405ms 以上を示した個体における最も多い疾患は拡張型心筋症および 2 型糖尿病であった (Fig. 11D, 11)。心臓弁膜症では加齢性の僧帽弁狭窄症が最も多く確認された。また、440ms 以上の補正 QT 間隔を示した個体ではすべてが何らかの基礎疾患を有していた。

これらの結果から、補正 QT 間隔が 405ms 以上の個体を対象として循環器特異的検査を実施することで様々な潜在性疾患を早期に診断することが可能であると考えられた。この結果はヒトでの報告と同様であり、ルーチン検査として

心電図検査を用いることが医科学研究や非ヒト霊長類の管理において有用であることを示唆している。

本研究においてはさらに補正 QT 間隔を含む心電図パラメータについて比較を行った (Table 10)。得られた補正 QT 間隔は既存の報告に比べて長い値を示した。これは手動計測により、より正確な RR および QT 間隔を測定したことによると考えられる [77]。また、得られた補正 QT 間隔はヒトの成人とよく近似した値を示していた [7, 61]。既報におけるカニクイザルの補正 QT 間隔は Bazett 式および Fridericia 式を用いて、おおよそ 200-300ms とされていた。一方、本研究により得られた新規補正式を用いた結果では補正 QT 間隔は 350-400ms、そして RR 間隔に影響されない結果を示した。これらのことから、QT 間隔補正においてこの式を利用することでヒトの診断基準をサル類へ転用することができる可能性を示唆した。

ヒトでは、QT 間隔は性差や加齢性の変化が認められると報告されている。しかし、本結果では加齢性変化および性差は認められていなかった (Fig. 11AB)。ヒトでは QT 延長症候群に関連する遺伝子が女性で多く発現することが報告されている [10, 46]。これらの遺伝学的研究は現在多くの研究機関によって研究途中であり、実際の遺伝子変異等が表現型に及ぼす影響なども未だ不明である [39]。また、研究施設内で生活するサル類は自然環境で生息するサル類に比べ活動量も少なく、外的ストレスも少ない状況であることから、こうした背景も表現型の一因となっている可能性が示唆される。こういった生活環境

が循環器疾患における表現型を左右するのであれば、ヒトにより近い存在である非ヒト霊長類は様々な循環器疾患に対する新たな治療的、診断的アプローチを可能とすると考えられる。こうした非ヒト霊長類の遺伝学的研究は未だ発展途上であり、性差や表現型の結果についても近い将来に報告されるだろう。

第5節 小括

以上より、本章ではカニクイザルの大規模繁殖群における若齢から老齢に渡る広い年齢層での心電図評価の基準となる値を報告した。また、QT 延長症候群の診断において重要な QT 補正式について、既報にある 6 種の補正式を検討し、使用可能な補正式を確認した。さらに、本実験群の 300 頭以上のカニクイザルを用いて RR 間隔と QT 間隔の相関をもとに $\dot{b}_{\dot{c}}$ べき指数を算出し、新規の QT 補正式を作成した。得られた新規補正式は既存の補正式に比べても良好な補正結果を示し、さらにはヒトの基準値と同等の結果を示した。

これらから、本研究結果は薬学および医学研究において非常に有用なデータを示しており、実験用霊長類の維持管理においても重要な役割を持つものであると考えられる。

第4章

心エコー図検査の基準値に関する研究

第1節 はじめに

心エコー図検査はヒトおよび獣医療において循環器疾患診断における重要な診断ツールとなっている。心エコー図検査では生体内の心臓構造や機能、血流などをリアルタイムに視覚的に描出することが可能であり、病態や機能の把握に特に有用である。

循環器疾患はヒトの死亡原因の2割ほどを占める疾患であり、その病態の把握は治療や創薬研究に有用である。サル類は冠動脈の走行や大動脈弓における分岐などがヒトに近似していることから、様々な循環器疾患モデルとしての可能性が示唆されている。一方で、サル類を用いた循環器疾患モデルの報告は少なく、ヒト医療への利用には課題が残されている。

循環器研究におけるサル類モデルの問題点としてはその基準値や検査ツールの制限が挙げられる。循環器機能は動物種ごとに様々であるため、サル類モデルにおいてもその基準値などの開発は急務である。超音波画像診断は近年の臨床医学や基礎研究において重要な検査ツールとなっているが、サル類において超音波診断法を用いて循環器系評価を実施した報告は少ない[40, 53, 85, 93, 97, 101]。その中でも特に心臓領域についてはほとんど報告がない。これらの少ない報告についても、様々な制約から症例数が少ない、年齢が限定されているなど動物種としての標準基準値を得るには至らなかった。加齢に関係すると

される心疾患もヒトなどでは多く報告されていることから、正常な加齢性変化についての検討は重要である[91]。

本研究ではヒトのモデル動物として循環器疾患研究を始めとした様々な医科学研究に用いられるカニクイザルについて、大規模繁殖群を用いた心エコー図検査における基準値および心臓機能や心臓サイズにおける加齢性変化の検討を行った。

第2節 材料および方法

本研究では、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて飼育・繁殖されている健康なカニクイザル 247 頭（メス 135 頭、オス 112 頭）を用いた（Table 12）。すべての動物は心臓超音波検査、心電図検査および胸部 X 線検査、心臓特異的ホルモンを含む血液生化学検査などを行い、心疾患が除外された個体を用いた。これらのサルは幅 50cm、奥行き 86cm、高さ 80cm の個別ケージ内で飼育され、飼育環境中の温度は夏場は $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、冬場は $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 50~60% で維持された。また、換気は毎時 12 回行われ、タイマーによる午前 7 時点灯、午後 7 時消灯の 12 時間照明が行われた。

また、全動物は定期健康診断により一般血液検査や胸部聴診ならびに身体検査を受けており、循環器系の異常は認められなかった。また、その他の全身性疾患も認められなかった。

本研究は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験倫理委員会の承認を受け、米国実験動物資源協会（ILAR）ならびに日本霊長類学会の定める非ヒト霊長類の実験的使用に関わるガイドラインに則り実施された[34, 35, 37]。

心臓超音波画像の収集

すべての検査は塩酸ケタミン (10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファーマ, 東京) 鎮静下で行った。心臓超音波画像は右側ならびに左側横臥位に保定し、胸部に接する部分を切り取ったカットアウトテーブルを用いて測定した。標準断面は右胸骨縁もしくは左側心尖部より取得した。心臓超音波画像計測には超音波画像診断システム (Prosound SSD-4000, Prosound α7, 日立ヘルスケア, 東京) を用いた。

なお、超音波画像検査は以下の3つの大項目ごとに実施し専門用語および手技は米国心臓超音波学会 (American Association of Echocardiography: ASE) のヒト用ガイドラインを用いた[56]

まず、第一に心臓内構造の計測を実施した。計測は左心房内腔径 (Left atrial diameter; LAD)、大動脈径 (Aorta diameter; AOD)、心室中隔壁厚 (Intraventricular septum; IVS)、左室心室内腔径 (Left ventricular inner dimension; LVID) および左室自由壁厚 (Left ventricular posterior wall thickness; LVPW) について行った。LAD は心房拡張期に、AOD については心室収縮期末期に測定し、それぞれの比率を LA/AO 比とした。また、LA/AO 比以外の上記の各項目は拡張期および収縮期の両期に測定を行った。

第二に心臓機能について評価した。心臓機能は一回拍出量 (Stroke volume; SV)、分時心拍出量 (Cardiac output; CO)、左室内径短縮率 (Fractional shortening of the left ventricle; FS) および左室駆出率 (Left ventricular ejection fraction; EF) を求めた。

最後に心臓内流出・流入路にあたる弁部の流速を求めた。弁部は左室流出路にあたる大動脈弁部流出速度 (Outflow velocity of Aortic valve; AV)、右室流出路にあたる肺動脈弁部流出速度 (Outflow velocity of Pulmonary valve; PV) および三尖弁流入速度 (Inflow velocity of tricuspid valve; TV) を測定した。僧帽弁流入速度は心室早期流入波 (Early wave; E wave) および心房収縮による心室後期流入波 (Atrial wave; A wave) の2相で測定した。二峰性の僧帽弁流入波が測定できない場合、測定された最高流入速度を E wave とした。

統計解析

統計は年齢および体重との相関を Pearson の積率相関係数を用いて解析した。さらに、全動物を既報に基づき Immature, Mature, Elderly の3群に分け、群間の比較には One-way analysis of variance (ANOVA) および Tukey 検定を実施した。3群は8歳以下の Immature 群、8歳以上20歳以下の Mature 群、20歳以上の Elderly 群とした[1, 16, 82, 111]。また、各項目について平均値および標準偏差を算出した。すべての統計解析は統計解析ソフトウェア (IBM SPSS Statics 20, IBM, NY, USA) を用いた。

基準となる参考範囲は95%信頼区間を持って99%のカバー率を維持するように設定した。

Table 12 供試動物の年齢および体重

	n	Weight (kg)		Age (year)	
		Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
Immature	90	3.24 \pm 0.97	1.41 - 5.68	4.1 \pm 1.5	0.0 - 6.4
Mature	114	4.60 \pm 1.15	2.22 - 7.49	11.8 \pm 3.7	6.5 - 19.3
Elderly	43	4.56 \pm 1.41	2.00 - 8.85	23.7 \pm 2.6	19.9 - 31.5
Total	247	4.10 \pm 1.31	1.41 - 8.85	11.1 \pm 7.4	0.0 - 31.5

第3節 結果

心臓構造

心臓の構造は体重および成長に従って相関し、拡大した。特に AODd, IVSd, LVPWd については特徴的であり、性成熟後には変化が認められなかった (Table 13, Fig. 13)。一方で、LADs は加齢とともに縮小したため、結果として LA/AO 比は成長ステージが進むに従い減少した (Fig. 13A, C)。こうした心臓内構造の成長に伴う伸長はすでに知られており、ヒトにおける既報とも同様の結果であった [32]。なお実際の心臓組織で計測した値と比較すると超音波診断装置を用いた心臓サイズの測定値はほぼ誤差のない結果を示した (Fig. 14)。

心臓機能

Table 14 には各種心臓機能パラメータの平均値および年齢および体重との相関を示した。SV および CO は体重に正の相関を示した。これらのパラメータは成長に従い増加し、心臓構造と似た分布を示した (Fig. 15A, B)。一方で、EF および FS は年齢との相関を示さず、体重とも相関しなかった (Table 14, Fig. 15C, D)。

心室流入および流出速度

カニクイザルにおける各弁部の心室流入速度を Table 14 に示した。AV, PV および TV などの心室流入および流出速度は成長や年齢との相関を示さなかった (Fig. 16A, B, C)。一方で、E wave は年齢および体重と負の相関を示した (Fig. 16D, G)。しかしながら、A wave は TV や AV と同様に年齢との相関は認められなかった (Fig. 16A, B, C, E, H)。さらに、E/A 比は加齢性および体重に相関して減少した (Fig. 16F, I)。これらは特に成長との相関性が認められた。

なお、心臓構造、心臓機能および流入・流出速度など、すべての項目について性差は認められなかった。

Table 13 心臓内構造の基準範囲と年齢および体重との相関

	All age		Reference Range			Correlation	
	Mean ± SD	Reference Range	Immature	Mature	Senior	Weight	Age
LADs (cm)	1.33 ± 0.26	1.30 - 1.36	1.24 - 1.33	1.33 - 1.44	1.20 - 1.34	.427***	.021***
AODd (cm)	0.87 ± 0.19	0.85 - 0.85	0.75 - 0.81	0.87 - 0.94	0.90 - 1.01	.421***	.328***
LA/AO ratio	1.58 ± 0.29	1.53 - 1.60	1.60 - 1.73	1.50 - 1.59	1.30 - 1.46	-0.039	-.325***
IVSd (cm)	0.46 ± 0.12	0.44 - 0.47	0.41 - 0.45	0.44 - 0.49	0.45 - 0.52	.351***	.188**
IVSs (cm)	0.62 ± 0.15	0.60 - 0.64	0.57 - 0.63	0.60 - 0.66	0.58 - 0.67	.323***	.130*
LVIDd (cm)	1.63 ± 0.34	1.59 - 1.68	1.46 - 1.59	1.69 - 1.81	1.46 - 1.65	.487***	0.056
LVIDs (cm)	1.03 ± 0.26	1.00 - 1.07	0.93 - 1.02	1.05 - 1.16	0.87 - 1.03	.359***	-0.033
LVPWd (cm)	0.44 ± 0.13	0.42 - 0.46	0.38 - 0.43	0.43 - 0.48	0.44 - 0.53	.324***	.223***
LVPWs (cm)	0.60 ± 0.14	0.58 - 0.61	0.53 - 0.58	0.60 - 0.65	0.55 - 0.66	.321***	.191***

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

LADs: Left atrium diameter in systole time

AODd: Aorta diameter in dilated time

LA/AO ratio: ratio of Left atrium / Aorta diameter

IVSd: Interventricular septum of dilated time

IVSs: Interventricular septum of systole time

LVIDd: Left ventricular inner dimension in dilated time

LVIDs: Left ventricular inner dimension in systole time

LVPWd: Left ventricular posterior wall thickness in dilated time

LVPWs: Left ventricular posterior wall thickness in systole time

Table 14 心臓機能と流入・流出速度の基準値に対する年齢および体重との相関

	All age		Reference Range			Correlation	
	Mean ± SD	95%CI	Immature	Mature	Senior	Weight	Age
SV (ml)	4.13 ± 2.37	3.83 - 4.43	2.88 - 3.51	4.57 - 5.48	2.86 - 4.44	.527***	0.074
CO (l/min)	0.62 ± 0.37	0.57 - 0.67	0.43 - 0.53	0.66 - 0.80	0.47 - 0.78	.481***	.143***
EF (%)	73.87 ± 9.26	72.71 - 75.03	72.25 - 75.36	71.35 - 75.22	73.02 - 78.35	-0.031	0.118
FS (%)	37.85 ± 7.78	36.88 - 38.83	35.72 - 38.40	36.37 - 39.50	36.91 - 41.89	0.039	.144**
AV outflow velocity (m/s)	0.78 ± 0.17	0.76 - 0.80	0.78 - 0.86	0.72 - 0.78	0.73 - 0.84	-0.023	-0.069
PV outflow velocity (m/s)	0.90 ± 0.21	0.87 - 0.92	0.86 - 0.95	0.82 - 0.90	0.92 - 1.08	0.088	.178***
E wave of MV (m/s)	0.72 ± 0.20	0.69 - 0.74	0.76 - 0.84	0.63 - 0.70	0.60 - 0.74	-.250***	-.261***
A wave of MV (m/s)	0.54 ± 0.17	0.51 - 0.57	0.49 - 0.58	0.50 - 0.58	0.47 - 0.64	0.075	0.079
E/A	1.29 ± 0.46	1.21 - 1.37	1.34 - 1.64	1.15 - 1.33	0.83 - 1.08	-.287**	-.600**
TV inflow velocity (m/s)	0.54 ± 0.21	0.51 - 0.57	0.53 - 0.61	0.48 - 0.57	0.43 - 0.58	-0.003	-0.089

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

SV: Stroke volume

CO: Cardiac output

EF: Ejection fraction

FS: Fractional shortening of the left ventricle

AV outflow velocity: Aorta valve outflow velocity

PV outflow velocity: Pulmonary valve outflow velocity

E wave of MV: Early wave of Mitral valve

A wave of MV: Atrial wave of Mitral valve

TV inflow velocity: Tricuspid Valve inflow velocity

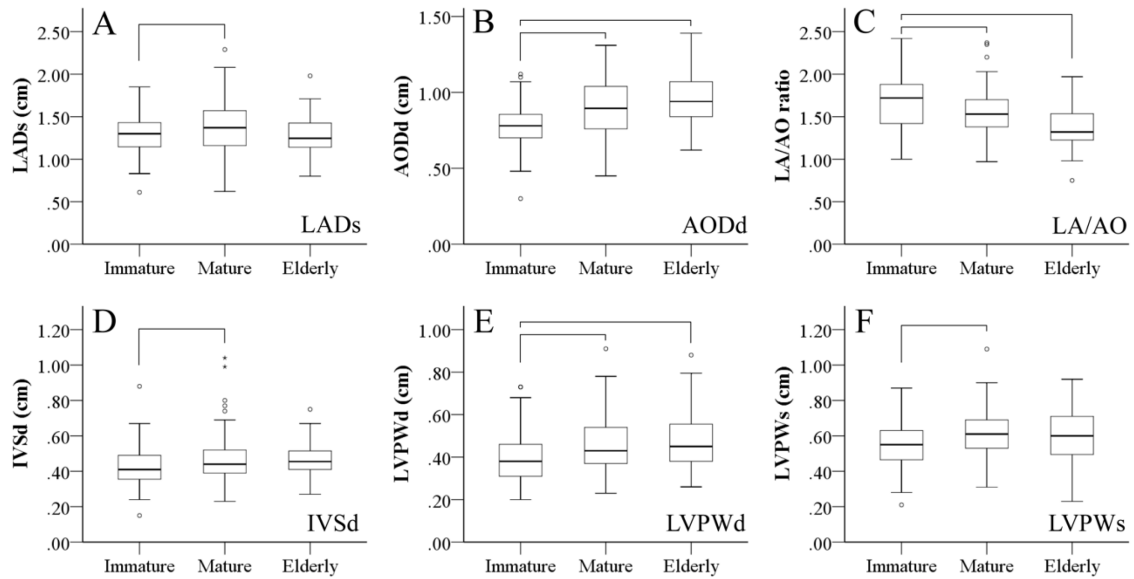


Fig. 13 心臓構造における加齢および体重との相関

左房内径([A])や中隔壁厚([D])は性成熟期に増加したものの、その後は変化しなかった。一方で大動脈径([B])や左室自由壁厚([E], [F])は加齢に伴い増加した。また、LA/AO比([C])は加齢に伴い低下した。

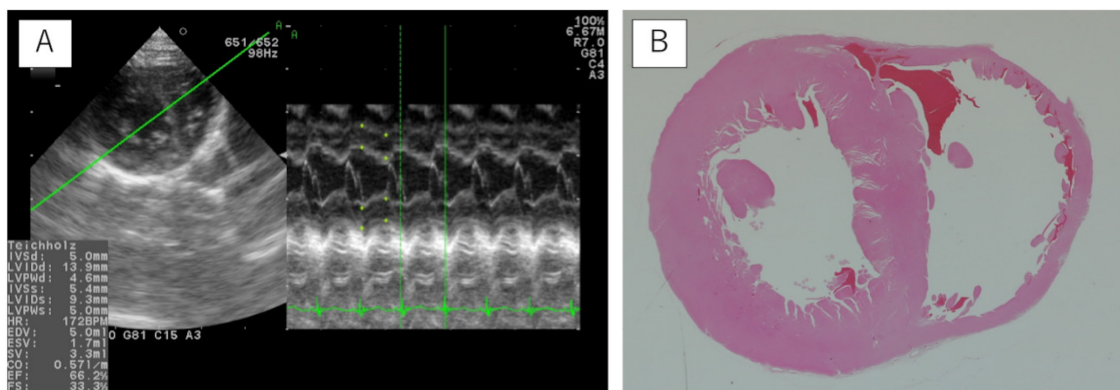


Fig. 14 心エコー図検査を用いた心室内構造評価と病理組織像の比較

左室短軸断面像におけるFAM (Free Angle Motion) -modeを用いて右心室壁、中隔、左心室壁厚および両内腔を経時的に可視化した ([A])。得られた数値は病理組織像 ([B]) における心室壁、内腔径と一致し、心エコー図検査の精度が確認された。

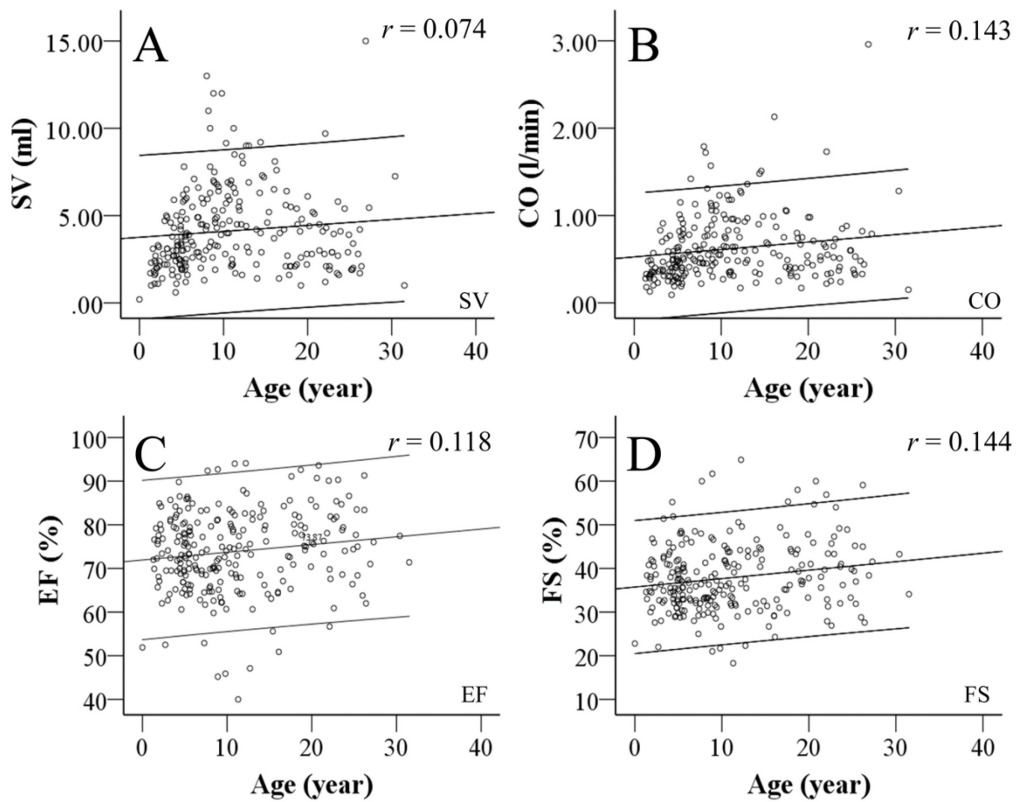


Fig. 15 左室収縮力の加齢性変化

一回拍出量(SV, A)および分時拍出量(CO, B)は心臓構造の拡大と同様に性成熟期に向けて増加し、その後は一定の値を示した。一方で、左室駆出率(EF, C)および左室内径短縮率(FS, D)は加齢との相関が認められなかった。

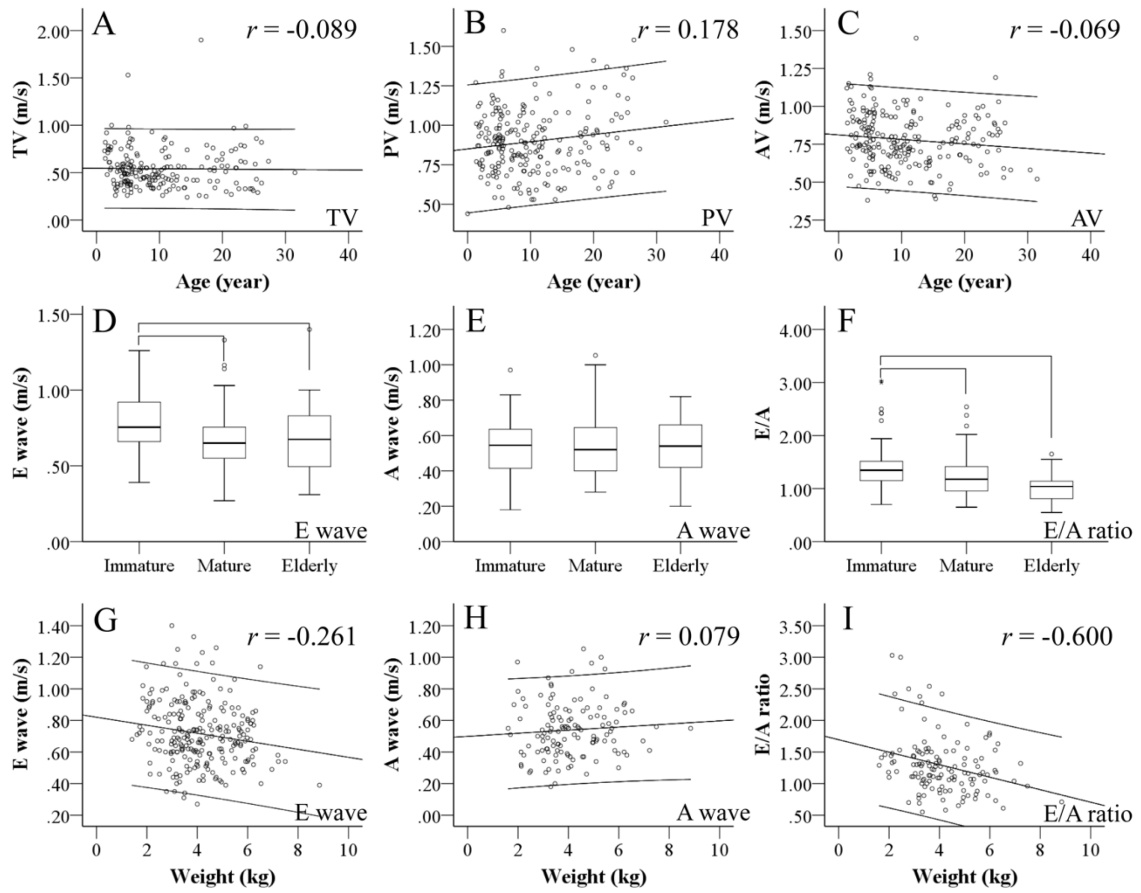


Fig. 16 弁部の流入・流出速度と成長ステージならびに体重との関係

三尖弁、肺動脈弁、大動脈弁の弁部流速は加齢と無相関であった。一方で、僧帽弁部の左室拡張早期流入血流速(Ewave, D)は加齢性の低下を示した。左房収縮期流入血流速(Awave, E)は変化せず、結果的に E/A 比(F)も加齢性低下を示した。これら僧帽弁部の流速は体重の増加とも相関傾向が認められ、加齢に伴う左室拡張能の低下が伺われた(G, H, I)。

第4節 考察

本研究ではカニクイザルの大規模繁殖コロニーにおける循環器疾患に罹患していない、健康なサルにおける広範囲な年齢層の心エコー図検査の基準となる値を明らかとした初の報告である。カニクイザルにおける心電図検査などの電気生理学的な報告ではヒトとカニクイザルは同様の生理学的機能を持つことが報告されている[73, 42]。しかしながら、心エコー図検査においてはその報告は少ない。心エコー図検査は非侵襲的であり、心電図検査よりもさらにリアルタイムに心機能を描出する手法で、診断能力に優れている。こうしたことから、実験動物としてのカニクイザルの心エコー図検査基準値は医学研究においても求められていた。

本研究において、LAD や IVS のような心臓構造は体重の増加に伴い有意に増加していた (Table 13)。年齢との相関は AOD および LVPW が Immature-Mature 間において増大していた (Table 13, Fig. 13B, E, F)。これらのデータからは心臓容積が体重とともに増大する一方、心臓構造も成長とともに増大し、性成熟とともに停止することが示された。一方で、LAD は変化が認められなかった。これにより、LA/AO 比は年齢ステージが進むごとに有意な低下を示した (Fig. 13A, C)。この傾向はヒトや他の動物でも認められている[89]。さらに、LVPWd は IVS が性成熟後に一定になるのに対し、性成熟後も継続して増加

しており、この結果はヒト同様であった (Table 13, Fig. 13D)。この結果から、心臓の構造増大には性成熟期における身体の成長が大きく影響することが示唆された[89]。

心臓機能では、特に SV および CO において体重および年齢依存性の増加が認められた。この結果は心臓サイズの増加と同様であり、身体の成長および心臓サイズの増大が心臓機能へと影響をもたらすことが示唆された。ヒトでは CO は加齢とともに変化せず、一方で、SV は年齢とともに増加するとされていた [45, 80]。しかしながら、本研究においては CO および SV は加齢とともにわずかに増加していた (Fig. 15A, B)。性成熟前後に注目すると CO および SV は性成熟期に増大し、性成熟後は一定の値を示した。CO は $SV \times$ 分時心拍数によって求められることから、心拍数が影響することは知られている。カニクイザルの分時心拍数は年齢によって変化しないことが報告されており、本研究結果における CO の増加はカニクイザルでは分時心拍数が加齢によって減少しないことによるものと考えられた[73]。FS および EF はヒトにおいて体重や心臓サイズに影響されない重要なパラメータである[98]。こうした背景から、本研究における FS および EF の値もカニクイザルにおける循環器疾患診断への有用性が示唆される[29, 93]。実際、FS および EF は本研究においても加齢に伴った変化は認められず、ヒトの結果を反映していた (Fig. 15)。一方で、この FS および EF の変化が心収縮力の変化を反映するとは言えないため、血管抵抗や心臓の収縮速度などと合わせて総合的に判断する必要がある。

AV, PV および TV の心室流入速度および流出速度は体重増加や年齢との相関は認められなかった (Fig. 16A, B, C)。安静状態を維持しているにもかかわらず心臓の収縮力に関係する SV, CO が一定である一方で、拡張機能を示す僧帽弁部流速の各項目にはいくつかの加齢性変化が認められた (Fig. 16D~I)。E wave は加齢性および体重依存性に低下し (Fig. 16D, G)、A wave はどの年齢ステージにおいても一定であった (Fig. 16E, H)。さらにこの結果から E/A 比は加齢に伴い減少を認めた (Fig. 16F, I)。心室の拡張における早期の拡張率は加齢に伴い低下する傾向が報告されている [9, 24, 69]。これは主に等容性拡張期の延長に由来すると考えられる。さらに、加齢性に弁の線維化や心室機能の低下などが影響するとされる [44, 92]。一方で、体重の増加に伴う MV 流速の減少については、Immature 群の体重の軽い個体が多いことによりバイアスが生じてしまったことが考えられる。

拡張機能などの心臓機能の低下は、加齢に伴う心筋細胞の Ca イオン動態障害による拡張機能低下や心筋細胞の線維化などが関与していると考えられている [23, 47]。さらに、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系などの内分泌環境の変化は拡張機能の低下に影響すると考えられる。しかしながら、心臓の拡張障害に関する分子生物学的研究は、カニクイザルでは少なく、今後このメカニズムを明らかにするためには分子生物学的研究は必須の課題であると考えられる。

左室流入速度は左心室機能を反映しており、E波の低下は心室の拡張機能の低下を反映している (Fig. 16D to I)。一方で、A waveは有意差がないものの、加齢性に増加が認められた (Table 14)。これらから、左室の拡張能の低下が左房の収縮により代償され、結果として心臓の駆出機能が一定に保たれていることが示唆される。さらに、心臓の拡張能低下はE waveの減衰時間が延長することによっても代償されると報告されている[73]。本研究においてはカニクイザルの心拍数が速いことにより減衰時間が測定できなかったことから、さらに高分解能の超音波画像検査装置を利用することで減衰時間についても検討することが必要と思われる。

第5節 小括

本章ではカニクイザル大規模繁殖コロニーにおける広年齢層の基準値を明らかにした。また、カニクイザルにおける心臓機能および構造には加齢に伴った変化が存在することが確認された。こうした心エコー図検査は近年のヒトの医学においては必要不可欠な存在となっており、実験動物においてもその需要は高まってきている。特に加齢と循環機能に関する研究は重要とされている。本研究で得られた基準値は先端医科学研究に必要不可欠なデータであり、非ヒト霊長類の管理や治療、研究における重要なツールとなると考えられる。

第 5 章

自然発症心疾患の診断と病態評価に関する研究

第1節 はじめに

心疾患はヒトの死因の上位を占めるが、病態は未だ全て明らかにされておらず、早急な解明が望まれている。心疾患診断には血液生化学検査、心エコー図検査、胸部 X 線検査そして心電図など多くの技術が組み合わされている。さらに、全血球計算やその他の生化学パラメータ、動脈・静脈血液ガスも用いられている。

特に、動脈血液ガスは呼吸器系や循環器系の影響を忠実に反映することから、重要な検査法として知られている。このため、診断用途のほか、麻酔時のモニタリングなどにおいて特に感度の高いセンサーとして用いられる。

心エコー図検査も非常に感度が高く、リアルタイムで循環動態および心臓の機能や構造を確認することのできる有用な検査法である。一方で、専門性が高く、技術的な成熟が検査には求められるため、万人が簡易に行うことはできない。動脈血液ガス検査および全血球計算は簡便な採血により行う検査法であり、採血を除けば技術的な誤差が少なく、ルーチンに行う検査法としては有効と考えられる [71, 72]。

先端医科学研究などに利用される実験動物のサルにおいても心疾患はヒトと同様に発生することが近年報告されてきている。したがってその研究的価値は増大しているものの、診断に必要な基礎的データは乏しく、他種動物などの外挿を用いて研究が行われてきた。

医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターは 1,400 頭以上の

実験用カニクイザルを繁殖・育成・管理する日本最大の研究施設であり、免疫学、感染症、遺伝子研究、再生医学研究ならびに老齡医学研究など様々な実験・研究を行う世界有数の施設である[2, 6, 26]。

それらのサル類に対して血液検査は日常的に行われる検査であり、動物の飼育管理への有用性が高いことが理解されている。血液検査によって種々の疾患を早期に発見することで、モデル動物としての有用性が高まるほか、実験時の麻酔管理や日々の動物管理においても血液検査は必要不可欠な検査となっている。本研究では、カニクイザルの大規模繁殖群を用いて、より簡便で感度の高い心疾患の検査法を検討するため、本研究課題第2章から第4章までの検討をもとに、動脈血液ガスおよび全血球計算を用いた心疾患のスクリーニングにおける診断精度の検討を行った。

第2節 材料および方法

実験には10歳以上のカニクイザル39頭（心疾患群19頭、コントロール群20頭）を用いた（Table 15）。すべての動物は医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて同一環境で繁殖・育成された。正常コントロール群には11歳から35歳の20頭の健康な個体を用いた。コントロール群はすべて定期的な健康診断を受けており、事前の検査においても胸部聴診、心電図、胸部X線検査および心エコー図検査において循環器疾患が存在しないことを確認した。また、食欲や活動性などの行動的異常も認められず、治療が必要な外傷なども存在しなかった。

心疾患群は心臓弁膜症（VD; Valvular disease）15症例、拡張型心筋症（DCM; Dilated cardiomyopathy）4症例の合計19症例を用いた。これらの動物も食欲および活動性などの行動的異常は認められず、特別な治療の必要のない個体であった。事前の検査はコントロール群同様に胸部聴診、心電図、胸部X線検査および心エコー図検査を実施しており、弁膜症では大動脈弁狭窄および肺動脈弁狭窄が最も多く認められた（Fig. 17）。また、心疾患個体の最小年齢が17歳であったことから、コントロール群においても年齢を心疾患群と適合させて選択した。

これらのサルは幅50cm、奥行き86cm、高さ80cmの個別ケージ内で飼育され、飼育環境中の温度は夏場は $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、冬場は $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は50~60%で維持された。また、換気は毎時12回行われ、タイマーによる午前7時点灯、

午後 7 時消灯の 12 時間照明が行われた。

また、全動物は定期健康診断により一般血液検査や胸部聴診ならびに身体検査を受けており、その他の全身性疾患についても除外された。

本研究は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験倫理委員会の承認を受け、米国実験動物資源協会 (ILAR) ならびに日本霊長類学会の定める非ヒト霊長類の実験的使用に関わるガイドラインに則り実施された[34, 35, 37]。

血液の採取

血液サンプルの採取はすべて塩酸ケタミン (10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファーマ, 東京) 鎮静下にて仰臥位に保定し、大腿動脈より行った。

得られた動脈血は 1ml 分取し、直ちにヘパリン処理を行い、オートアナライザー (RapidLab 3 48, Siemens, ドイツ) を用いて解析を行った。動脈血液ガスの検査項目は pH, Partial pressure of arterial CO₂ (PaCO₂), Partial pressure of arterial O₂ (PaO₂), Sodium ion (Na⁺), Potassium ion (K⁺), Chloride (Cl), Calcium ion (Ca⁺⁺), Bicarbonate ion standard (HCO₃std), Base excess in vitro (BE(vt)), Total carbon dioxide concentration (ctCO₂), Calculated Calcium ion with pH 7.4 (Ca⁺⁺(7.4)), Anion gap (AnGap), Saturation of arterial O₂ (SaO₂) の 12 項目を検討した。また、

Sodium ion および Chloride についてはその比率 (Na/Cl) を求めた。

また、一部の血液は直ちに EDTA 処理し、自動血球分析装置 (KX-21, Sysmex, 神戸) を用いて解析を行った。血算は白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、血小板数 (PLT) と、赤血球恒数のうち、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を検討した。また、赤血球のサイズのばらつきを表す赤血球容積分布幅 (RDW)、血小板のサイズを表す血小板容積分布幅 (PDW)、血小板項数である平均血小板容積 (MPV)、大型血小板比率 (P-LCR) についても検討した。

統計解析

統計解析は心疾患群とコントロール群に関して両側 Welch の T 検定を行った。P 値は 0.05 以下を有意とした。さらに、弁膜症および拡張型心筋症、コントロールの 3 群については One-way analysis of variance (ANOVA) および Tukey 検定を行った。すべての検定は R (ver. 3.3.2, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) および R commander (ver. 2.3-0) を改変した EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉) を用いた [49]。グラフデータには表計算ソフト (Microsoft Office Excel 2016; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を使用した。

Table 15 供試動物の分類と年齢および体重

	Sex	n	Mean Age (year)	Mean Weight(kg)
コントロール群	Male	3	28.7	6.12
	Female	17	19.8	4.02
DCM	Male	2	29.5	6.20
	Female	2	18.5	3.79
弁膜症	Male	4	24.3	5.55
	Female	11	29.7	3.63

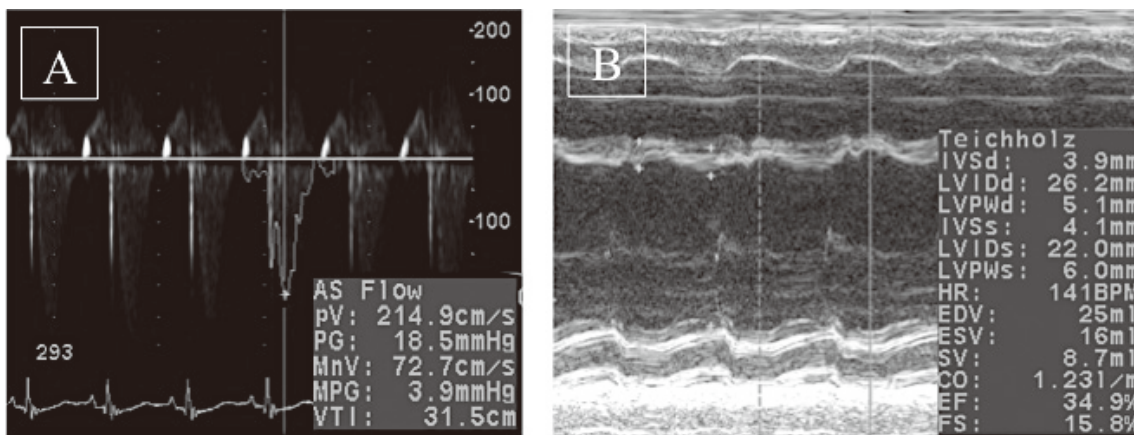


Fig. 17 心疾患群カニクイザルにおいて得られた心エコー図検査所見
 自然発症のカニクイザルにおいて認められた心疾患は心臓弁膜症(僧帽弁逆流
 214.9cm/s, A)や拡張型心筋症(FS 15.8%, B)であった。

第3節 結果

コントロール群および疾患群の群間における動脈血液ガス、全血球計算結果を Table 16 および 17 に示した。また、心疾患群の内訳として、弁膜症群および拡張型心筋症群の両群間の平均値を Table 18 および 19 に示した。

動脈血液ガス分析

動脈血液ガス分析結果はいくつかのパラメータにおいて疾患群との間に有意な差が認められた (Table 16, 18)。PaCO₂ および ctCO₂ などの血中二酸化炭素濃度に特徴的差異が認められ、これらは疾患群で有意な高値を認めた。血液 pH の重炭酸平衡の中心的存在である HCO₃⁻ はわずかに高い値を示したが、有意差は認められなかった。一方で、補正 HCO₃⁻ は有意な増加を認めた。補正 HCO₃⁻ はヒトの医療において Anion gap が崩れた状況下での HCO₃⁻ の実濃度を調べるための方法である [59, 71]。電解質分析では Potassium ion および塩化物イオン、Na/Cl 比が有意に増加した。

疾患群間での比較では、補正 HCO₃⁻ および PaCO₂、Na/Cl 比が弁膜症群で上昇しており、特に補正 HCO₃⁻ で顕著な上昇が認められた (Fig. 18)。

全血球計算

いくつかのパラメータについて疾患群とコントロール群との間に有意差が認められた (Table 17, 19)。特に RDW の増加および MCHC の低下は著しかった。

さらに、分散分析においては RDW, MCV, MCH, MCHC の各項目で有意差を認めた (Fig. 19)。また、MCV, MCH, MCHC の各値は疾患群間では拡張型心筋症群において有意な上昇を認めた (Fig. 19B, C, D)。

Table 16 心疾患群およびコントロール群の動脈血液ガス分析結果

Parameters	Unit	CVD			Control			Significant difference
		mean	median	SD	mean	median	SD	
pH		7.40	7.40	0.06	7.41	7.41	0.04	
PaCO ₂	mmHg	39.16	39.85	5.04	34.32	34.40	4.58	*
PaO ₂	mmHg	95.22	91.60	12.86	94.54	96.40	10.36	
Na ⁺	mmol/l	147.30	148.00	3.59	146.76	148.00	3.62	
K ⁺	mmol/l	4.01	3.93	0.54	3.67	3.65	0.45	*
Cl	mmol/l	105.90	106.50	3.00	107.94	108.00	2.21	*
Ca ⁺⁺	mmol/l	1.22	1.23	0.08	1.18	1.19	0.06	
HCO ₃ ⁻	mmol/l	23.74	24.25	3.23	22.42	22.30	2.79	
BE	mmol/l	-0.78	0.05	4.11	-2.56	-2.60	3.42	
ctCO ₂	mmol/l	24.96	25.20	3.98	22.34	22.90	3.63	0.05
Ca ⁺⁺ (7.4)	mmol/l	1.22	1.21	0.07	1.19	1.19	0.06	
AnGap		17.67	16.45	4.44	16.40	17.40	3.73	
SaO ₂	%	97.03	97.00	1.09	97.18	97.20	0.77	
Na/Cl		1.39	1.40	0.03	1.36	1.36	0.03	*
cHCO ₃ ⁻	mmol/l	25.40	26.00	2.99	22.82	23.00	2.73	*

* $p < 0.05$

Table 17 心疾患群およびコントロール群の全血球計算結果

	Unit	CVD			Control			Significant difference
		mean	median	SD	mean	median	SD	
WBC	10 ² /μl	92.21	96.00	30.91	86.73	91.00	27.24	
RBC	10 ² /μl	687.53	674.00	89.62	673.55	673.50	93.04	
HGB	g/dl	13.17	12.80	1.91	13.28	13.25	1.78	
HCT	%	46.36	45.40	6.60	45.55	46.65	5.72	
MCV	fl	67.59	67.00	5.59	67.83	67.75	2.86	
MCH	pg	19.23	18.70	2.07	19.78	19.45	1.34	
MCHC	g/dl	28.42	27.80	1.22	29.14	29.10	1.18	0.07
PLT	10 ⁴ /μl	33.25	31.70	8.50	33.53	30.95	13.16	
RDW	fl	35.68	35.50	3.47	31.55	33.50	5.34	*
PDW	fl	11.72	11.60	1.52	11.82	11.00	2.03	
MPV	fl	9.82	9.60	1.01	10.00	10.00	1.08	

* $p < 0.05$

Table 18 疾患群における動脈血液ガス分析結果

	Unit	DCM		VD		
		Mean	Median	Mean	Median	SD
pH		7.41	7.42	7.40	7.41	0.05
PaCO ₂	mmHg	37.30	35.25	39.57	40.30	4.59
PaO ₂	mmHg	102.68	103.80	94.61	90.00	12.90
Na ⁺	mmol/l	141.75	141.50	148.33	148.00	2.09
K ⁺	mmol/l	4.20	4.51	3.90	3.77	0.47
Cl	mmol/l	104.00	104.00	106.13	107.00	2.85
Ca ⁺⁺	mmol/l	1.20	1.19	1.22	1.22	0.07
HCO ₃ ⁻	mmol/l	23.50	23.90	24.13	24.90	3.19
BE	mmol/l	-1.30	-0.75	-0.23	0.80	4.11
ctCO ₂	mmol/l	24.13	23.15	25.49	25.70	3.99
Ca ⁺⁺ (7.4)	mmol/l	1.20	1.20	1.23	1.21	0.07
AnGap		14.25	14.70	18.07	17.10	4.35
SaO ₂	%	97.65	97.90	97.10	97.00	0.73
Na/Cl		1.36	1.36	1.40	1.40	0.03
cHCO ₃ ⁻	mmol/l	21.75	21.50	26.20	26.00	2.20

Table 19 疾患群における全血球計算結果

	Unit	DCM		VD		
		mean	median	mean	median	SD
WBC	$10^2/\mu l$	108.25	109.50	85.64	95.50	26.89
RBC	$10^2/\mu l$	594.25	626.00	715.14	711.00	76.12
HGB	<i>g/dl</i>	13.10	14.00	13.23	12.80	1.73
HCT	%	43.80	45.85	47.16	45.55	6.54
MCV	<i>fl</i>	73.45	73.55	65.93	65.05	5.31
MCH	<i>pg</i>	21.85	22.30	18.51	18.25	1.64
MCHC	<i>g/dl</i>	29.73	30.45	28.09	27.80	0.89
PLT	$10^4/\mu l$	37.60	31.55	31.09	31.75	6.55
RDW	<i>fl</i>	34.93	36.00	35.89	34.95	3.70
PDW	<i>fl</i>	12.45	12.15	11.50	11.25	1.65
MPV	<i>fl</i>	10.63	10.45	9.56	9.40	0.96

WBC; White blood cell count, RBC; Red blood cell count, HGB; Hemoglobin, HCT; Hematocrit, MCV; Mean corpuscular volume, MCH; Mean corpuscular hemoglobin, MCHC; Mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT; Platelet cell count, RDW; Red blood cell distribution width, PDW; Platelet cell distribution width, MPV; Mean platelet volume

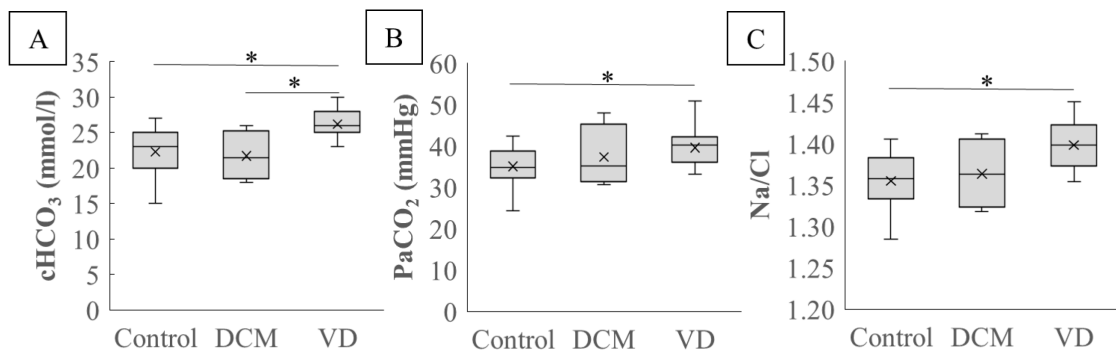


Fig. 18 動脈血液ガス分析における心疾患のサブグループごとの解析

図は四分位範囲を示す。箱の上下はそれぞれの最大および最小値を示し、平均値に線を、中央値に×を示す。弁膜症群は補正重炭酸濃度が有意に増加しており(A)、同様に PaCO₂ 濃度も高値を示した(B)。それに伴いも増加した。Na/Cl 比は VD 群で高く、Cl の低下が認められた(C) (* $p < 0.05$)

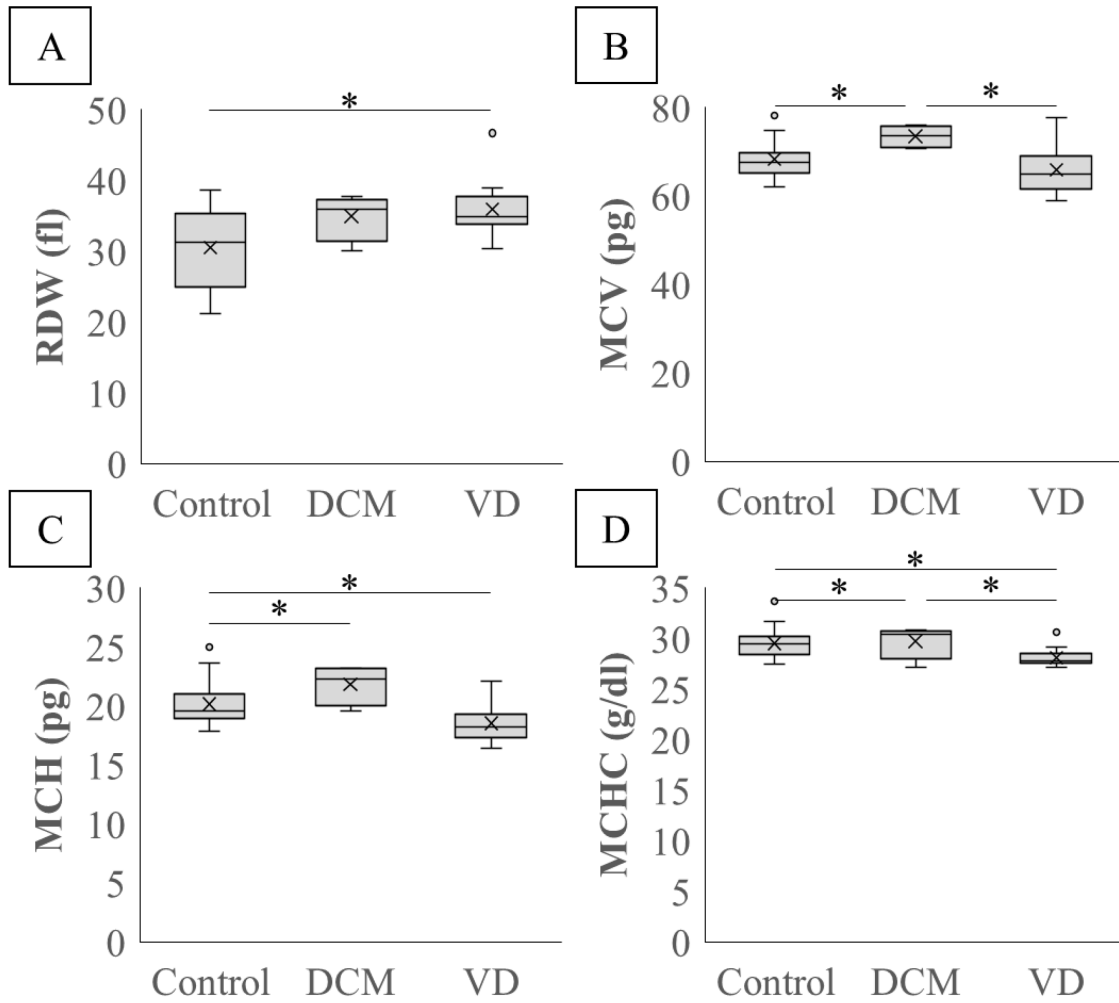


Fig. 19 全血球計算における疾患群間における解析

図は四分位範囲を示す。箱の上下はそれぞれの最大および最小値を示し、平均値に線を、中央値に×を示す。全血球計算では疾患群における多血傾向のほか、RDWの増加が認められた(A)。特に弁膜症群では赤血球恒数が著しく低値を示しており(B, C, D)、造血機能が亢進していることが疑われた。

第4節 考察

動脈血液ガス分析

今回、心エコー図検査及び心電図検査により心疾患群に分類された個体においては臨床兆候は認められなかった。一方で、 PaCO_2 および ctCO_2 は心疾患群において有意に増加した。これらの数値は既報値より上昇しており、異常値であると考えられる[71]。心疾患個体の CO_2 濃度上昇は、臨床症状は認められないものの、肺循環の悪化による肺への血流の滞留などが考えられるが、その本態は不明である。さらに、補正 HCO_3^- も上昇し、代謝性アルカローシスの存在も疑われた。ヒトでは、補正 HCO_3^- はAnion gapが開大した場合のイオン動態を速やかに反映する指標として知られる[51]。

さらに、 Na/Cl 比の上昇も認められ、内因性の生理化学物質であるレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の活性化に伴う循環の変化が補正 HCO_3^- の増加と協力的に関与していると考えられる。

全血球計算

心疾患群において、RDWが有意に増加した(Table 17)。RDWは近年ヒト医学における統計学的解析によって様々な循環器疾患をはじめとした慢性炎症性疾患との関連性が示唆されている。一方でその機序はまだ不明ではあるが、慢性の循環低下に伴って赤血球細胞膜の安定性が減少し、破壊される細胞数が増加

する一方で、赤血球再生が急激に行われる結果と考えられている。RDW は元来は貧血の指標として臨床にも用いられていた項目であるが、こうした赤血球の破壊と再生が発生する循環器疾患においてもその関連性が示唆されている[12, 17, 67, 100]。本研究の心疾患群において RDW は有意に増加しており、ヒトで想定されるような生体内の生理学的機構が心疾患病態に影響したと考えられる。

MCHC は心疾患群において減少傾向を示した (Fig. 19D)。RDW は前述のように増加しているが (Fig. 19A)、慢性的な赤血球への負荷が赤血球再生を引き起こし、MCV, MCH, MCHC の低下と関連していると考えられる (Fig. 19B-D) [17]。

心疾患群における各種検査および病理組織学的所見の検討

以上のように心疾患群では各血液学的パラメータにおいて上昇が認められ、病理組織診断の結果と一致した。すなわち、心疾患群には心臓弁膜症（大動脈弁逆流、肺動脈弁逆流、僧帽弁逆流、三尖弁逆流、大動脈弁狭窄、肺動脈弁狭窄、僧帽弁狭窄、三尖弁狭窄）および拡張型心筋症が認められた。これらの個体は、組織学的所見や心エコー図検査、胸部 X 線検査および心電図検査では重度の線維化や心筋の変性が認められており、明らかな心疾患の発症が確認されている (Fig. 17)。一方で、これらの個体では異常行動は認められていないことから、心疾患のグレードとしては軽度のものであったと考えられる。本研究

においては補正 HCO_3^- および PaCO_2 、 Na/Cl 比は心臓弁膜症群において有意な高値を示していた (Fig. 18A, B, C)。心臓弁膜症は高齢のサルにおいてもヒト同様に認められており、この結果はヒト同様に循環悪化に伴う呼吸性アシドーシスならびに代謝性アルカローシスが複合して発生していた可能性を示唆している [70]。このように軽度の心疾患において動脈血液ガスが鋭敏に反応を示していたことから、スクリーニングにおける高い診断的有用性が示唆される。一方で、カニクイザルを含むマカク属サル類において補正 HCO_3^- および心疾患との関連性を検討した報告はなく、本研究の結果は非ヒト霊長類の獣医学的管理にも有用と考えられる。

全血球計算では赤血球系のいくつかの項目に有意な変化が認められた。RDW については特に弁膜症とコントロール群間で有意な上昇を認めた (Fig. 19A)。さらに、同様に RDW に関連する赤血球恒数に関しても有意な増加を認めた。拡張型心筋症群においては MCV, MCH, MCHC などが増加しており、大赤血球症の可能性が示唆された。一方で、MCHC は弁膜症群において低下しており、ヘモグロビンの減少とともに症状を示さない慢性炎症が存在していたことが考えられた [100]。

第5節 小括

本章では、血液検査をはじめとする様々な検査法を並行して用いることで非ヒト霊長類における心疾患の病態を明らかにすることができた。野生個体由来である実験用霊長類は身体の不調を隠す傾向があり、行動変化のみで病態を確実に把握することは熟練を要する。心疾患に罹患した動物では麻酔や外科的侵襲により容易に病態が悪化することが考えられ、早期の診断は獣医学的管理の側面においても重要である。

今回、心疾患群はコントロール群に比較して動脈血液ガス分析においてPaCO₂や重炭酸イオン濃度などにおいて有意な増加を示していた。動脈血液ガスは循環や呼吸器動態を忠実に反映することから、これを測定し、動物の状態を把握することが今後の医科学研究において重要であることが確認された。

また、非ヒト霊長類はアニマル・ウェルフェアの観点からも安全に低侵襲に維持することが求められる。こうした動物の管理において、動脈血液ガスを含む血液検査によってその病態を把握することは不可欠と考えられる。

第6章 総括

循環器疾患はがん（悪性新生物）、脳血管疾患とならび、ヒトの死因の上位を占める疾患である。そのため、国内外の多くの研究機関においては循環器疾患に特化した研究が推進されている。循環器ではその中心となる心臓のみならず、腎泌尿器や腸肝循環、脳血流など様々な要因が交差し、複雑に絡み合うことから、*in vivo* 研究が重要であることが知られている。医学研究は近年、細胞を用いた細胞生理学・細胞生物学から ES/iPS 細胞を用いた発生生物学、実験動物を用いた実験動物学といった広い分野を網羅して発展しており、実験動物を用いた研究については動物愛護などの観点からコンピューターシミュレーションや代替法を用いる世界的な潮流が存在する。そのような状況の中で、実験動物は生体の複合的な生理動態を反映する唯一の存在であり、研究の発展には不可欠である。このため、様々な動物モデルとして、遺伝子導入や遺伝子変異、免疫誘導などによる疾患モデルマウスや疾患モデルラットが用いられている。こうしたモデルは様々な基礎研究の発展に寄与しており、多くの新薬の上市を支えてきた。

一方で、心筋細胞を始めとする種々の細胞において動物種間の差異が存在することが知られている。特に心筋細胞におけるイオンチャネルの発現は小動物とヒトとの間で異なることが知られ、上市した新薬の撤退例も知られている。これを受けて、医薬品規制調和国際会議（ICH）はサルをはじめとした中・大型動物を用いた前臨床試験の重要性を提言している。

非ヒト霊長類はヒトと遺伝学的に最も近縁とされ、生理学的・解剖学的にも非常に近似した形態を持つ。さまざまな生体反応は動物種によって異なることから、ヒトのモデルとして最も有用なモデルとされ、様々な創薬・医学研究に用いられてきた。狭鼻猿類に属するカニクイザルはヒトと同じ霊長類に属し、チンパンジーやオランウータンについて近縁な種であり、現在ヒトに最も近い実験動物として知られている。循環器研究分野においてもカニクイザルなどのサル類を用いた研究は重要視されているものの、血液検査値や心電図などの基礎的報告は少なく、ヒトや他の動物の外挿によって研究が行われていた。しかしながら、動物種間には生理学的機能の差異が存在することから、さらなる研究の発展にはサル類に特化した基礎データの蓄積が重要と考えられた。本研究は先端医学において近年需要の増加しているカニクイザルについて、特に循環器生理学について、基礎的データを蓄積し、病態評価への検討を行った。また、得られた結果をもとにサル類の病態把握に理想的な検査法を検討し、アニマル・ウェルフェアの観点からも検討を行った。

1. 循環器疾患診断のための血液検査基準値に関する研究

血液検査は低侵襲で多くの情報を得ることのできる有用な検査法であることから、臨床および研究分野においてルーチンで行われる。このような傾向はサル類においても同様である一方、サル類における基礎的データはほとんど報告されていなかった。第2章では、これまであまり報告されていなかった非ヒト

霊長類、特に実験用カニクイザルにおける血液学的基準値を求めた。血液学は特に一般的に臨床や研究など様々な分野において使用される全血球計算、全身の循環動態や呼吸動態を迅速に忠実に反映する指標である。本章では麻酔管理や循環器疾患や腎泌尿器、代謝性疾患などの様々な診断において指標として用いられている動脈血液ガスについて検討を行い、年齢や性別などの観点から基準値を求めた。

本章では、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて繁殖・飼育されているカニクイザル 62 頭を用いて血液学における基礎的データの収集を目的として検討を行った。

動脈血液ガスについては血液中二酸化炭素濃度に関連する PaCO_2 および ctCO_2 の 2 項目において、オスで有意に高い値を示した。一方で、その他の項目については有意差を認めなかった。また、老齢化に伴い、 PaCO_2 、 HCO_3^- 、BE、 ctCO_2 などは増加が認められ、特に HCO_3^- および ctCO_2 では Immature-Mature 群間で、BE は Immature-Mature 群間で有意差を認めた。 PaCO_2 は若齢では変化が認められないが Senior 群において有意な増加を認めた。静脈血液ガスにおいて検討されたアカゲザルにおける既報やヒトにおける研究との比較において、サル類では BE がヒトに比べ低い傾向を示すこと、血液 pH はヒトと同様であることなどが確認された。また、これらの CO_2 および重炭酸平衡は高齢化に伴って劇的に増加することが示唆され、加齢や肺機能の低下などにより容易に変動することが示唆された。

一方で、全血球計算においても赤血球関連項目に関して雌雄間および加齢性の変化が認められた。雌雄間では MCV および MCH がオスで有意に高い値を示した。また、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値に加齢性の増加を認めた。年齢群においては特に Senior 群において赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の有意な増加を認めた。全血球計算においては先行研究において同じマカク属のアカゲザルにおいて MCV および MCH はヒトに比べ低い値を示すとされており、本研究においても同様の結果を示した。また、その他の数値に関してもアカゲザルと近い結果を示しており、マカク属内での差はないものと考えられた。一方で、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値がメスでやや高い値を示していた。高齢のヒトでは一般的に赤血球関連数値は低下するとされているが、動物においては赤血球表面蛋白の変性などにより酸素運搬能が低下し、膜安定性も低下することから、赤血球産生が促されることが報告されている。本研究群は繁殖コロニーであるため、メス個体の高齢割合がやや高くなっており、それが結果に影響したものと考えられる。

動脈血液ガスおよび全血球計算の結果は加齢や脱水、炎症など様々な全身状態を反映する。循環動態の加齢による変化はこうした血液学的数値に対して影響を及ぼし、結果として様々な数値の変化をもたらす。

本研究では、世界で初めて実験用カニクイザルの大規模繁殖コロニーにおける若齢から高齢までを含めた広い範囲での全血球計算および動脈血液ガス基準値を確立した。カニクイザルをはじめとした非ヒト霊長類は平均寿命が 30 年

と非常に長く、老年医学研究においても有用なモデルとして知られている。本研究ではカニクイザルの老化に伴う動脈血液ガスおよび全血球計算の変化を評価し、様々な数値が変動することを見出した。ここで得られた結果は本邦における循環器をはじめとした研究の基盤となるだけでなく、国内外の霊長類を用いた医科学研究において、重要な報告となるだろう。また、得られた結果は多くの実験施設において飼育される実験用霊長類の治療・診断などの獣医学的ケアならびに動物群の維持・管理、実験における様々な管理法へと応用される結果となるだろう。

2. 正常心電図およびQT補正式に関する研究

心電図検査はヒト医療・獣医療において重要な心疾患診断ツールである。第3章では循環器診断の中心的役割を担う心電図検査について検討を行った。カニクイザルの遺伝学的距離は現在研究に用いられる実験用動物の中で最もヒトに近縁で、その相同性は98%に迫る。中でも循環器は動物種差が多く報告される分野であり、特に心臓におけるイオンチャネルの分布は動物種差が著しい。様々な創薬研究においては特に致死性の副作用に関連する不整脈および心筋細胞傷害・変性における検討が必須となっており、日・米・欧の規制当局および製薬に関する専門家を集めた国際的な枠組みであるICHにおいてもサル類を含む大型動物を用いた検討の必要性が示されている。一方で、日本をはじめとする各国において医学研究用実験動物として用いられるカニクイザルにおける心電図の研

究報告は前臨床試験等における個体ごとの検討に限られ、大規模な基礎的データの研究は殆ど行われていなかった。本研究ではこれらの背景を踏まえ、医科学研究に重要なカニクイザルの心電図基準値を確立するとともに、創薬における副作用検討において特に重要な心電図の QT 間隔とその理想的な補正式を検討した。また、大規模実験群における蓄積されたデータをもとに本実験群を対象とした新規 QT 補正式を作成し、その補正精度についても検討を行った。

その結果、心電図の各項目において雌雄間における有意な差は認められなかった。また、心疾患を有する個体と比較すると R 波の振幅や QRS 時間、QT 間隔などに明らかな違いが確認された。ヒトと比較すると電位は概ね同様であったが、一方でそれぞれの時間や間隔は短縮していた。また、前胸額面電気軸もヒトと同様の結果であった。

QT 補正式である Bazett 式は心電図補正において医学・獣医学において最も頻繁に用いられてきた手法である。しかしながら、これらを用いた研究報告は若齢のサルのものに限られていた。一方、QT 延長症候群などの心疾患の多くは加齢性に増加することが知られている。このことから QT 補正式の老齢での検討および QT 間隔の加齢による影響の研究は急務であった。

本章では既存の 6 種の補正式を用いて検討を行い、Bazett 式において補正後の QT 間隔と RR 間隔において無相関の結果を示した。一方、ヒトで小児において適応される Fridericia 式は弱い相関を示し、心拍数の補正には不適であった。新規補正式は RR 間隔と補正前 QT 間隔の相関係数をもとに算出したべき指数を

Bazett 式や Fridericia 式で用いられる指数式に導入し、作成した。

新規補正式を用いた補正 QT 間隔は Bazett 式を用いた補正 QT 間隔と比較してよりヒトに近い値を示した。

ヒトにおいては女性では QT 延長症候群のリスクが高く、平均的な QT 間隔も延長していることが知られている。本研究におけるカニクイザルの QT 間隔は性差が認められず、さらに年齢や体重との相関も認められなかった。

一方で、ヒトの QT 延長症候群の診断指標となる 440ms 以上を示したすべての個体では心臓弁膜症や左脚ブロックなど、心筋・心臓構造異常の疾患の異常が確認され、405ms 以上でもほとんどの個体に糖尿病を含む全身性疾患が確認された。

以上より、本研究ではカニクイザルの大規模繁殖群における若齢から老齢までの広い年齢層における心電図基準値を確立した。また、QT 延長症候群の診断において重要な QT 補正式を検討し、Bazett 式の有用性を確認した。さらに大規模繁殖群で得られた RR 間隔および QT 間隔からべき指数を算出し、カニクイザルに対応した補正式を作成した。得られた補正式は既存式に比べて良好な補正を示した。

本研究結果は創薬研究および医学研究において、有用なデータを示しており、実験用霊長類の維持管理においても重要な役割を持つと考えられる。

3. 心エコー図検査の基準値に関する研究

超音波画像診断法は生体内を非侵襲的に、リアルタイムで描出することので

きる有用な検査法である。中でも循環器診療においては心エコー図検査が広く用いられている。しかし、ヒトのモデル動物として用いられるカニクイザルにおける体系的な心臓機能評価基準は報告されていなかった。第4章では、実験用カニクイザルの若齢から老齢までの広い年齢層の全247頭について心疾患をはじめとする疾患のない健常個体における心臓の構造・機能・内部流速に関して心エコー図検査を用いて検討を行った。また、得られた値から、平均値および標準偏差、信頼区間を算出し、基準値を確立した。さらに老化の影響を強く受けると考えられる心機能について、加齢性変化を検討した。

その結果、心臓の構造は体重の増加に相関して変化した。一方、年齢とは性成熟前までは相関が認められるものの、性成熟後は一定の値を示した。これは身体サイズの変化と一致しており、成長とともに心臓が拡大したことを示している。一方で、収縮期左房内径は年齢と相関せず、一定の値を示していた。これにより健常個体ではLA/AO比は減少していた。高齢個体では心疾患が多くなることにより左房の後負荷を表すLA/AO比は増加すると考えられていたが、この結果により心疾患が存在しない健常個体ではLA/AO比が増加しない可能性が示された。

心臓機能については循環に関連する一回拍出量および分時拍出量、左室内径短縮率および左室駆出率の4項目について検討を行った。一回拍出量および分時拍出量は体重と正の相関を示し、心臓構造の変化と同様の結果を示した。一方で左室内径短縮率および左室駆出率は年齢および体重と相関しなかった。ヒ

トでは一回拍出量は加齢とともに増加するが、分時拍出量は加齢に逆相関すると報告されている。これは分時拍出量が一回拍出量および分時心拍数によって定義されることに由来し、心拍数が加齢に伴って減少することによって起こる結果と考えられる。一方でカニクイザルでは第3章で示したように心拍数が速く、加齢によっても変化しない。これによりカニクイザルでは加齢に伴う増加というヒトと異なる結果となったと考えられる。一方で、左室内径短縮率および左室駆出率はヒトと同様に年齢および体重とは無相関の結果を示しており、カニクイザルにおける生理学的な循環動態がヒトと同様であることが確認された。

心室流入および流出速度に関しては大動脈弁流速、肺動脈弁流速、僧帽弁流速、三尖弁流速を測定した。大動脈弁、肺動脈弁、三尖弁に関しては年齢および加齢に無相関であった。一方で、僧帽弁流速ではE波の加齢性減速が認められ、心室拡張機能の低下が示唆された。一方でA波は変わらず、心房内圧は変動しないことが示唆された。このことから、心筋の等容性拡張期の延長がE波の低下をもたらし、E波における減衰時間が延長することにより結果的に一定の駆出量を維持していることが示唆された。一方で体重の増加に伴う僧帽弁流速の低下は未成熟な Immature 群では体重が軽い個体が多いことによるバイアスが影響していることが考えられた。

以上より、本章においてはカニクイザル大規模繁殖コロニーにおける広年齢域の心エコー図検査基準値を確立した。また、カニクイザルにおける心臓機能

および構造の加齢性変化を確認した。一方でヒトの既報では報告されていなかった心房負荷の変化などの新規知見が確認され、カニクイザルを用いた研究の有用性も再確認された。こうした心エコー図検査は医学・獣医学の必要不可欠な項目となっており、加齢と循環器機能などの総合的な研究において本研究データは重要な基盤となるだろう。

4. 自然発症心疾患の診断と病態評価に関する研究

前章までの研究により、ヒト医学研究モデルとしてのカニクイザルにおける基礎的基準値が確立された。これらをもとに、第5章ではカニクイザル心疾患モデルの安定的な作出を目指して自然発症の心疾患ザル探索用スクリーニング法を検討した。循環器疾患は日本をはじめとする世界各国において悪性新生物や脳・心臓血管疾患とならぶ死因である。とくに心臓弁膜症や心筋症などは投薬によるコントロール法も未だ研究の途中であり、心臓移植や弁置換術などの侵襲的治療法が行われている。カニクイザルはヒトに非常によく似た心臓機能や構造を持ち、遺伝学的にも近縁であることから移植免疫学や再生医学など様々な研究において用いられている。一方で、心疾患は複雑な病態をもち、より臨床的なモデルは治療方法や創薬の研究の点からも期待されている。

本章では第2章から第4章までの基準値データをもとに、医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて飼育されているカニクイザル

繁殖群における血液検査を用いた心疾患スクリーニング法の確立を目的として全血球計算および動脈血液ガスの心疾患における診断的有用性を検討した。

結果として、心疾患群においては心電図、心エコー図検査において明らかな正常所見との違いが確認された。心電図検査や心エコー図検査の結果をもとにした臨床診断において、心疾患群は大きく心臓弁膜症群および拡張型心筋症群に分類された。

この分類をもとに第2章において確立した動脈血液ガスおよび全血球計算の基準値の評価を行った結果、動脈血液ガスにおいては特に PaCO₂ 濃度に有意な高値が認められた。これらの変化は循環器疾患による全身循環および肺循環の機能低下による反応と考えられた。また、補正重炭酸イオン濃度も同様に有意な高値を認めており、血液ガスの変化に対応する重炭酸緩衝系の反応が示唆された。全血球計算においては心疾患群では赤血球数の増加が認められた。RDW

(赤血球容積分布幅) は特に弁膜症において有意な高値を認めており、赤血球恒数が著しく低下していたことから赤芽球系の造血亢進による赤血球数および RDW の増加であると考えられた。拡張型心筋症では RDW は高い傾向にあるものの、赤血球数および赤血球恒数は正常群と差は認められなかった。本研究では例数が非常に少ないことから今後例数を増やすことで心疾患サブクラスにおける全血球計算への影響を評価することが可能になると考えられる。

本研究により全血球計算および動脈血液ガス、心電図検査や心エコー図検査の臨床的有用性が確認され、心疾患診断への応用が期待された。

血液を用いた検査法は非常に簡便で安定性が高いことからスクリーニングへの応用が期待される。本研究成果を応用することにより、より高率に疾患診断が可能となり、安定した心疾患ザルの抽出が可能となるだろう。また、モデル作成においても本基準値を用いることにより、より詳細なクラス分けや診断が可能となり、ヒトモデルとしての有用性への貢献が期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究のご指導を賜りました日本大学 大学院 獣医学研究科の鯉江 洋教授に深甚なる謝意を表すとともに、ご助言および論文のご校閲を賜りました同大学院の山谷 吉樹教授、佐藤 雪太教授に深謝いたします。

さらに本研究を実施するにあたり研究施設のカウンターパートとして多くのご助言、ご示唆を頂いた国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターの揚山 直英 主任研究員、山海 直 主任研究員に深謝いたします。

参考文献

1. Ageyama, N., Kurosawa, H., Fujimoto, O., Uehara, T., Hiroe, M., Arano, Y., Yoshida, T., Yasutomi, Y. and Imanaka-Yoshida, K. 2019. Successful Inflammation Imaging of Non-Human Primate Hearts Using an Antibody Specific for Tenascin-C. *Int. Heart J.* **60**: 151-158.
2. Ageyama, N., Seki, Y., Muneyuki, K., Kandori, A., Tsukada, K. and Terao, K. 2007. Application of magnetocardiography for non-human primate arrhythmia models. *The Journal of Japan Biomagnetism and Bioelectromagnetics Society.* **20**: 90-91.
3. Ando, K., Hombo, T., Kanno, A., Ikeda, H., Imaizumi, M., Shimizu, N., Sakamoto, K., Kitani, S., Yamamoto, Y., Hizume, S., Nakai, K., Kitayama, T. and Yamamoto, K. 2005. QT PRODUCT: in vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation. *J. Pharmacol. Sci.* **99**: 487-500.
4. Astrup, P. and Severinghaus, J. W. 1989. 生理学の夜明け-血液ガスと酸塩基平衡の歴史 (監訳; 吉矢生人, 森隆比古). 真興交易医書出版部.
5. Atkins, C. E, Dickie, B. C. 1986. Electrocardiogram of the clinically normal ketamine-sedated *Macaca fascicularis*. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 455-457.
6. Bashuda, H., Kimikawa, M., Seino, K., Kato, Y., Ono, F., Shimizu, A., Yagita, H., Teraoka, S. and Okumura, K. 2005. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* **115**: 1896-1902.
7. Benatar, A and Decraene, T. 2001. Comparison of formulae for heart rate correction of QT interval in exercise ECGs from healthy children. *Heart.* **86**: 199-202.
8. Blume, S. and Geesink, I. 2000. A brief history of polio vaccines. *Science.* **288**: 1593-1594.
9. Bryg, R. J., Williams, G. A. and Labovitz, A. J. 1987. Effect of aging on left ventricular diastolic filling in normal subjects. *Am. J. Cardiol.* **59**: 971-974.
10. Chauhan, V. S., Krahn, A. D., Walker, B. D., Klein, G. J., Skanes, A. C., Yee, R. 2002. Sex

differences in QTc interval and QT dispersion: dynamics during exercise and recovery in healthy subjects. *Am. Heart J.* **144**: 658-664.

11. Chaves, A. A, Keller, W. J., Sullivan, S. O., Fitzgerald, L. E., McPherson, H. E., Goykhman, D., Ward, P. D., Hoe, C. M., Mixon, L. and Briscoe, R. J. 2006. Cardiovascular monkey telemetry: sensitivity to detect QT interval prolongation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **54**: 150-158.
12. Danese, E., Lippi, G. and Montagnana, M. 2015. Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases . *J. Thorac. Dis.* **7**: 402-411.
13. David Cyranoski, MONKEY KINGDOM -China is positioning itself as a world leader in primate research., 2016. *Nature.* **532**: 300-302.
14. Dickinson, D. F. 2005. The normal ECG in childhood and adolescence. *Heart.* **91**: 1626-1630.
15. Einthoven, W. Pflüger, Arch. Weiteres über das Elektrokardiogram. 1908. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* **122**: 517-584.
16. Ekanayake, D.K., Horadagoda, N.U., Sanjeevani, G.K., Arulkanthan, A., Gunatilake, K.A. and Dittus, W.P. 2003. Hematology of a natural population of toque macaques (*Macaca sinica*) at polonnaruwa, Sri Lanka. *Am. J. Primatol.* **61**: 13-28.
17. Felker, G. M, Allen, L. A., Pocock, S. J., Shaw, L. K., McMurray, J. J., Pfeffer, M. A., Swedberg, K., Wang, D., Yusuf, S., Michelson, E. L. and Granger, C. B. 2007. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**: 40-47.
18. Food and Drug Administration, HHS 2005. International Conference on Harmonisation; guidance on E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs; availability. *Notice. Fed Regist.* **70**: 61134-61135.
19. Food and Drug Administration, HHS 2005. International Conference on Harmonization; guidance on S7B nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals; availability. *Notice. Fed Regist.* **70**:

61133-61134.

20. Fowler, M.E. and Miller, R.E., 2003. Reference range of clinical test items. Non Ape Primates. pp. 357-359, 381-384. In: Zoo and Wild Animal Medicine, 5th ed. (Murray E. Fowler R. Eric Miller), Elsevier, Amsterdam.
21. Furesz, J. 2006. Developments in the production and quality control of poliovirus vaccines -- historical perspectives. *Biologicals*. **34**: 87-90.
22. Gauvin, D. V., Tilley, L. P., Smith, F. W. Jr and Baird, T. J. 2006. Electrocardiogram, hemodynamics, and core body temperatures of the normal freely moving cynomolgus monkey by remote radiotelemetry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. **53**: 140-151.
23. Gazoti Debessa C. R., Mesiano Maifrino L. B. and Rodrigues de Souza R. 2001. Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech. Ageing Dev*. **122**: 1049-1058.
24. Gerstenblith, G., Frederiksen, J., Yin, F. C., Fortuin, N. J., Lakatta, E. G. and Weisfeldt, M. L. (1977) Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation*. **56**: 273-278.
25. Gonder, J. C., Gard, E. A. and Lott, N. E. 1980. Electrocardiograms of 9 species of nonhuman primates sedated with ketamine. *Am. J. Vet. Res.* **41**: 972-975.
26. Goto, Y., Hiramatsu, Y., Ageyama, N., Sato, S., Kanemoto, S., Sato, Y. and Sakakibara, Y. 2014. Cardiopulmonary bypass induces recruitment of bone marrow-derived leukocytes to the lungs in monkeys. *Ann. Thorac. Surg.* **97**: 617-622.
27. 五島雄一郎, 大林完二. 心電図の ABC (日本医師会編) . 1993. 日本医師会, 東京.
28. Guralnik, J.M., Eisenstaedt, R.S., Ferrucci, L., Klein, H.G. and Woodman, R.C. 2004. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood*. **104**: 2263-2268.
29. Gutgesell, H. P., Paquet, M., Duff, D. F. and McNamara, D. G. 1977. Evaluation of left ventricular size and function by echocardiography results in normal children. *Circulation*. **56**: 457-462.

30. Hacker, T. A., McKiernan, S. H., Douglas, P. S., Wanagat, J. and Aiken, J. M. 2006. Age-related changes in cardiac structure and function in fischer 344 x Brown Norway hybrid rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **290**: 304-311.
31. Hassimoto, M., Harada, T., Kaga, N., Murano, H. and Obata, M. 2002. Accurate evaluation of QT interval in conscious rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) by use of Holter ECG. *J. Electrocardiol.* **35**: 333-342.
32. Henry, W. L., Ware, J., Gardin, J. M., Hepner, S. I., Mckay, J. and Weiner, M. 1978. Echocardiographic measurements in normal subjects. Growth-related changes that occur between infancy and early adulthood. *Circulation.* **57**: 278-285.
33. Hom, G.J., Bach, T.J., Carroll, D., Forrest, M.J., Mariano, M.A., Trainor, C.E., Wang, P.R. and MacIntyre, D.E. 1999. Comparison of Cardiovascular Parameters and/or Serum Chemistry and Hematology Profiles in Conscious and Anesthetized Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **38**: 60-64.
34. Honjo, S. 1985. The Japanese Tsukuba Primate Center for Medical Science (TPC): an outline. *J. Med. Primatol.* **14**: 75-89.
35. Honjo, S. 1986. Guiding Principles for animal experiments using nonhuman primates. *Primate Research.* **2**: 111-113.
36. Ihrig, M., Tassinary, L.G., Bernacky, B. and Keeling, M.E. 2001. Hematologic and serum biochemical reference intervals for the chimpanzee (*Pan troglodytes*) categorized by age and sex. *Comp. Med.* **51**: 30-37.
37. ILAR, C. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals (8th ed.). Washington (DC): National Academies Press.
38. Imanishi, S., Arita, M., Aomine, M. and Kiyosue, T. 1983. Electrocardiogram and His bundle electrogram of Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jikken Dobutsu.* **32**: 167-173.
39. Imboden, M., Swan, H., Denjoy, Van, Langen, I.M., Latinen-Forsblom P. J., Napolitano, C.,

- Fressart, V., Breithardt, G., Berthet, M., Priori, S., Hainque, B., Wilde, A. A., Schulze-Bahr, E., Feingold, J. and Guicheney, P. 2006. Female predominance and transmission distortion in the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* **355**: 2744-2751.
40. 坂本晃海, 峰重隆幸, 李佳穎, 関布美子, 佐々木えりか, 井上貴史. コモンマーモセットの超音波検査画像アトラスの作成. 2019. 第162回日本獣医学会総会 *Proceedings*. 516.
41. Isa, T., Yamane, I., Hamai, M. and Inagaki, H. 2009. Japanese macaques as laboratory animals. *Exp. Anim.* **58**: 451-457.
42. Ishizaka, T., Yoshimatu, Y., Ozawa, M., Kimotsuki, T., Takasaki, W., Manabe, S. and Yasuda, M. 2009. Age-related differences of QT interval and autonomic nervous system activity in female cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **60**: 288-295.
43. Ito-Fujishiro, Y., Koie, H., Nakayama, S., Shibata, H., Okabayashi, S., Katakai, Y., Kanayama, K., Yasutomi, Y., Ageyama, N. 2018. Superparamagnetic Iron Oxide-enhanced Magnetic Resonance Imaging of Spontaneous Hepatic Neoplasia in a Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). *Comp. Med.* **68**: 233-238.
44. Iwase, M., Nagata, K., Izawa, H., Yokota, M., Kamimura, S., Inagaki, H. and Saito, H. 1993. Age-related changes in left and right ventricular filling velocity profiles and their relationship in normal subjects. *Am. Heart. J.* **126**: 419-426.
45. Izzo, C., Carrizzo, A., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., Frati, G., Oliveti, M., Damato, A., Ambrosio, M., De Caro, F., Remondelli, P. and Vecchione, C. 2018. The Impact of Aging on Cardio and Cerebrovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: pii: E481..
46. J. N. Johnson and M. J. Ackerman. 2009. QTc: how long is too long?. *Br. J. Sports Med.* **43**: 657-662.
47. Jalil, J. E., Doering, C., Janicki, J. S., Pick, R., Shroff, S. G. and Weber, K. T. 1989. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ. Res.* **64**: 1041-1050.

48. Jeffry, W. R. and Meg, M. S. 2014. *Electrocardiography of Laboratory Animals*. Elsevir, UK.
49. Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR” (Easy R) for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. **48**: 452-458.
50. 川喜田愛郎, 近代医学の史的基盤, 1977, 岩波書店, 東京.
51. Kim, E. B., Susan, M.B., Scott, B. and Heddwen L. B. 2006. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 22th ed., McGraw-Hill Education, New York City.
52. Koie, H., Ageyama, N., Ono, F., Kanayama, K., Sakai, T. and Sankai, T. 2005. Echocardiographic diagnosis of muscular ventricular septal defect in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci*. **44**: 26-28.
53. Korcarz, C. E., Padrid, P. A., Shroff, S. G., Weinert, L. and Lang, R. M. 1997. Doppler echocardiographic reference values for healthy rhesus monkeys under ketamine hydrochloride sedation. *J. Med. Primatol*. **26**: 287-298.
54. 厚生労働省医薬品局, ヒト用医薬品の心室内再分極遅延 (QT 間隔延長) の潜在的可能性に関する非臨床的評価ガイドライン. 2009.
55. Koyama, H., Yoshii, H., Yabu, H., Kumada, H., Fukuda, K., Mitani, S., Rousselot, J. F., Hirose, H. and Uchino T. 2004. Evaluation of QT interval prolongation in dogs with heart failure. *J. Vet. Med. Sci*. **66**: 1107-1111.
56. Lang, R. M., Badano, L. P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Flachskampf, F. A., Foster, E., Goldstein, S. A., Kuznetsova, T., Lancellotti, P., Muraru, D., Picard, M. H., Rietzschel, E. R., Rudski, L., Spencer, K. T., Tsang, W. and Voigt, J. U. 2015. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. **16**: 233-270.
57. Längin, M., Mayr, T., Reichart, B., Michel, S., Buchholz, S., Guethoff, S., Dashkevich, A., Baehr, A., Egerer, S., Bauer, A., Mihalj, M., Panelli, A., Issl, L., Ying, J., Fresch, A. K., Buttgerit, I.,

- Mokelke, M., Radan, J., Werner, F., Lutzmann, I., Steen, S., Sjöberg, T., Paskevicius, A., Qiuming, L., Sfriso, R., Rieben, R., Dahlhoff, M., Kessler, B., Kemter, E., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Klett, K., Hinkel, R., Kupatt, C., Falkenau, A., Reu, S., Ellgass, R., Herzog, R., Binder, U., Wich, G., Skerra, A., Ayares, D., Kind, A., Schönmann, U., Kaup, F. J., Hagl, C., Wolf, E., Klymiuk, N., Brenner, P. and Abicht, J. M. Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. 2018. *Nature*. **564**: 430-433.
58. Lee, J. I., Hong, S.H., Lee, S.J., Kim, Y.S. and Kim, M.C. 2003. Immobilization with Ketamine HCL and Tiletamine-Zolazepam in Cynomolgus Monkeys. *J. Vet. Sci.* **4**: 187-191.
59. Lee, J.I., Shin, J.S., Lee, J.E., Jung, W.Y., Lee, G., Kim, M.S., Park, C.G. and Kim, S.J. 2012. Reference values of hematology, chemistry, electrolytes, blood gas, coagulation time, and urinalysis in the Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Xenotransplantation*. **19**: 244-248.
60. Limparasutr, V., Saengklub, N., Meedeche, P., Kijawornrat, A. and Hamilin, R. L. 2017. Characteristics of electromechanical window in anesthetized rabbit models of short QT and long QT syndromes. *J. Toxicol. Sci.* **42**: 579-587.
61. Luo, S., Michler, K., Johnston, P. and Macfarlane, P. W. 2004. A comparison of commonly used QT correction formulae: the effect of heart rate on the QTc of normal ECGs. *J. Electrocardiol.* **37**: Suppl:81-90.
62. Malhotra, V., Pick, R., Pick, A. and Glick, G. 1975. Electrocardiographic studies in stump-tail macaque (*Macaca arctoides*). *J. Electrocardiol.* **8**: 247-251.
63. Malinow, M. R. 1966. An electrocardiographic study of *Macaca mulatta*. *Folia Primatol. (Basel)* **4**: 51-65.
64. Malinow, M. R. and DeLannoy, C. W. 1967. The electrocardiogram of *Macaca fuscata*. *Folia Primatol. (Basel)* **7**: 284-291.
65. Malinow, M. R. and Hackel, D. B. 1966. Abnormal ventricular repolarization in *Macaca mulatta*. *Am. Heart J.* **71**: 140.

66. Mason, J. W., Ramseth, D. J., Chanter, D. O., Moon, T. E., Goodman, D. B. and Mendzelevski, B. 2007. Electrocardiographic reference ranges derived from 79,743 ambulatory subjects. *J. Electrocardiol.* **40**: 228-234.
67. Mazzotta, E., Guglielmini, C., Mencioti, G., Contiero, B., BoranToaldo, M., Berlanda, M. and Poser, H. 2016. Red blood cell distribution width, hematology, and serum biochemistry in dogs with echocardiographically estimated precapillary and postcapillary pulmonary. *J. Vet. Intern. Med.* **30**: 1806-1815.
68. 宮井潔, 我が国における臨床検査医学の歩みと展望. 2010. *生物試料分析*. **33**: 93-102.
69. Miyatake, K., Okamoto, M., Kinoshita, N., Owa, M., Nakasone, I., Sakakibara, H. and Nimura, Y. 1984. Augmentation of atrial contribution to left ventricular inflow with aging as assessed by intracardiac Doppler flowmetry. *Am. J. Cardiol.* **53**: 586-589.
70. Mrsic, Z., Hopkins, S. P., Antevil, J. L. and Mullenix, P. S. 2018. Valvular Heart Disease. *Primary Care*. **45**: 81-94.
71. Nakayama, S., Koie, H., Kanayama, K., Katakai, Y., Ito-Fujishiro, Y., Sankai, T., Yasutomi, Y. and Ageyama, N. 2017. Establishment of reference values for complete blood count and blood gases in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 881-888.
72. Nakayama, S., Koie, H., Kanayama, K., Katakai, Y., Ito-Fujishiro, Y., Sankai, T., Yasutomi, Y. and Ageyama, N. 2018. Utility of arterial blood gas, CBC, biochemistry and cardiac hormones as evaluation parameters of cardiovascular disease in nonhuman primates. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 1165-1173.
73. Nakayama, S., Koie, H., Kato-Tateishi, M., Pai, C., Ito-Fujishiro, Y., Kanayama, K., Sankai, T., Yasutomi, Y. and Ageyama, N. 2019. Establishment of a new formula for QT interval correction using a large colony of cynomolgus monkeys. *Exp. Anim.* In press.
74. 日本製薬工業協会, 製薬協ガイド 2009. 2009. 日本製薬工業協会, 東京.
75. 二村泰治, 心エコー法の創始時代, 2000. *心エコー*. **1**: 96-99.

76. 二村泰治, 心エコー法のモノクロ時代-心臓診断法の革命. 2000. *心エコー*. **1**: 398-403.
77. Pieter, G. P. and Arthur, A. M. W. 2014. The Measurement of the QT Interval. *Current Cardiology Reviews*. **10**: 287-294.
78. Qiu, H., Depre, C., Ghosh, K., Resuello, R. G., Natividad, F. F., Rossi, F., Peppas, A., Shen, Y. T., Vatner, D. E. and Vatner, S. F. 2007. Mechanism of gender-specific differences in aortic stiffness with aging in nonhuman primates. *Circulation*. **166**: 669-676.
79. 岡島光治, 心電図 ME の 100 年. 1990. *BME*. **4**: 4-12.
80. Rodeheffer, R. J., Gerstenblith, G., Becker, L. C., Fleg, J. L., Weisfeldt, M. L. and Lakatta, E. G. 1984. Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation*. **69**: 203-213.
81. Ruan, Q. and Nagueh, S. F. 2005. Effect of age on left ventricular systolic function in humans: a study of systolic isovolumic acceleration rate. *Exp. Physiol*. **90**: 527-534.
82. Sato, A., Fairbanks, L. A., Lawson, T. and Lawson, G. W. 2005. Effects of age and sex on hematologic and serum biochemical values of vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaues*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci*. **44**: 29-34.
83. Schuurman, H.J. and Smith, H.T. 2005. Reference values for clinical chemistry and clinical hematology parameters in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation*. **12**: 72-75.
84. Silver, A.J. 1990. Aging and risks for dehydration. *Cleve. Clin. J. Med*. **57**: 341-344.
85. Sleeper, M. M., Gaughan, J. M., Gleason, C. R. and Burkett, D. E. 2008. Echocardiographic reference ranges for sedated healthy cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Am. Assoc Lab. Anim. Sci*. **47**: 22-25.
86. Smucny, D.A., Allison, D.B., Ingram, D.K., Roth, G.S., Kemnitz, J.W., Kohama, S.G., Lane, M.A. and Black, A. 2001. Changes in blood chemistry and hematology variables during aging in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *J. Med. Primatol*. **30**: 161-173.

87. Smucny, D.A., Allison, D.B., Ingram, D.K., Roth, G.S., Kemnitz, J.W., Kohama, S.G., Lane, M.A. and Black, A. 2004. Changes in blood chemistry and hematology variables during aging in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol* 30:161-173, 2001. *J. Med. Primatol.* **33**: 48-54.
88. Soloviev, M. V., Hamlin, R. L., Barrett, R. M., Chengelis, C. P. and Schaefer, G. J. 2006. Different species require different correction factors for the QT interval. *Cardiovasc. Toxicol.* **6**: 145–157.
89. Strait, J. B. and Lakatta, E. G. 2012. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail. Clin.* **8**: 143-164.
90. Sugiyama, A. 2008. Sensitive and reliable proarrhythmia in vivo animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodeled hearts. *Br. J. Pharmacol.* **154**: 1528-1537.
91. Swinnen, M., Vanhoutte, D., Van Almen, G. C., Hamdani, N., Schellings, M. W., D'hooge, J., Van der Velden, J., Weaver, M. S., Sage, E. H., Bornstein, P., Verheyen, F. K., VandenDriessche, T., Chuah, M. K., Westermann, D., Paulus, W. J., Van de Werf, F., Schroen, B., Carmeliet, P., Pinto, Y. M. and Heymans, S. 2009. Absence of thrombospondin-2 causes age-related dilated cardiomyopathy. *Circulation.* **120**: 1585-1597.
92. Takenaka, K., Dabestani, A., Waffarn, F., Gardion, J. M. and Henry, W. L. 1987. Effect of left ventricular size on early diastolic left ventricular filling in neonates and in adults. *Am. J. Cardiol.* **59**: 138-141.
93. Tang, H. L., Wang, L. L., Cheng, G., Wang, L and Li, S. 2008. Evaluation of the cardiovascular function of older adult rhesus monkeys by ultrasonography. *J. Med. primatol.* **37**: 101-108.
94. Tatsumi, K., Hannhart, B., Pickett, C. K., Weil, J. K. and Moore, L. G. 1991. Influences of gender and sex hormones on hypoxic ventilatory response in cats. *J. Appl. Physiol.* **71**: 1746-1751.
95. Taylor, K. and Gleason, C. 2010. Effect of body position on limb-lead electrocardiographic findings in sedated cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **49**: 352-356.

96. TERUMO, CO. LTD. 医療の挑戦者たち (24) 心臓の刺激伝導系の解明, <https://www.terumo.co.jp/challengers/challengers/24.html> (In japanese)
97. Tsusaki, H., Yonamine, H., Tamai, A., Shimomoto, M., Iwao, H., Nagata, R. and Kito, G. 2005. Evaluation of cardiac function in primates using real-time three-dimensional echocardiography as applications to safety assessment. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **52**: 182-187.
98. 筒井裕之, 磯辺光章, 伊藤宏, 伊藤浩, 奥村謙, 小野稔, 北風政史, 絹川弘一郎, 木原康樹, 後藤葉一, 小室一成, 齋木佳克, 斎藤能彦, 坂田泰史, 佐藤直樹, 澤芳樹, 塩瀬明, 清水渉, 下川宏明, 清野精彦, 野出孝一, 肥後太基, 平山篤志, 眞茅みゆき, 増山理, 室原豊明, 百村伸一, 矢野雅文, 山崎健二, 山本一博, 吉川勉, 吉村道博. 急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017年改訂版). 2018. 日本循環器学会・日本心不全学会, 東京.
99. 津谷喜一郎, 市場撤退役の諸相. 2009. *臨床薬理*, **4**: 7-16.
100. Tonelli, M., Sacks, F., Arnold, M., Moye, L., Davis, B. and Pfeffer, M. 2008. Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. *Circulation.* **117**: 163-168.
101. Ueda, Y., Gunther-Harrington, C. T., Cruzen, C. L., Robert, J. A. and Stern, J. A. 2017. Echocardiographic Parameters of Clinically Normal Geriatric Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **56**: 361-368.
102. Videan, E.N., Fritz, J. and Murphy, J. 2008. Effects of aging on hematology and serum clinical chemistry in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am. J. Primatol.* **70**: 327-338.
103. Vito, G. S., Charlotte, E. H., Paul, C. L. and Joseph, L M. 2012. Hematopoietic, Cardiovascular, Lymphoid and Mononuclear Phagocyte Systems of Nonhuman Primates. pp. 357-354. In: Nonhuman Primates in Biomedical Research: Diseases, 2nd ed., (Christian, R. A., Keith, M. Suzette, T. and Timothy, M. eds.) Elsevier, UK.
104. Wilde, H. 1958. Functional electrocardiographic abnormalities. *N. Engl. J. Med.* **258**: 735-738.
105. Yamaoka, A., Koie, H., Sato, T., Kanayama, K. and Taira, M. 2013. Standard

Electrocardiographic Data of Young Japanese Monkeys (*Macaca fusucata*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **52**: 491-494.

106. Yan, G., Zhang, G., Fang, X., Zhang, Y., Li, C., Ling, F., Cooper, D. N., Li, Q., Li, Y., van Gool, A. J., Du, H., Chen, J., Chen, R., Zhang, P., Huang, Z., Thompson, J. R., Meng, Y., Bai, Y., Wang, J., Zhuo, M., Wang, T., Huang, Y., Wei, L., Li, J., Wang, Z., Hu, H., Yang, P., Le, L., Stenson, P. D., Li, B., Liu, X., Ball, E. V., An, N., Huang, Q., Zhang, Y., Fan, W., Zhang, X., Li, Y., Wang, W., Katze, M. G., Su, B., Nielsen, R., Yang, H., Wang, J., Wang, X., Wang, J. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques. 2011. *Nat. Biotechnol.* **29**: 1019-1023.
107. Yokoyama, H., Nakamura, Y., Saito, H., Nagayama, Y., Hoshiai, K., Wada, T., Izumi-Nakaseko, H., Ando, K., Akie, Y. and Sugiyama, A. 2017. Pharmacological characterization of microminipig as a model to assess the drug-induced cardiovascular responses for non-clinical toxicity and/or safety pharmacology studies. *J. Toxicol. Sci.* **42**: 93-101.
108. Yoshida, T. and Fujimoto, K. 2006. Cynomolgus monkeys as a medical science research resources - Ikagaku kenkyu shigen toshiteno kanikui zaru. 1st ed., Springer Japan, Tokyo. (in Japanese)
109. Yoshimatsu, Y., Ishizaka, T., Chiba, K. and Mori, K. 2018. Usefulness of simultaneous and sequential monitoring of glucose level and electrocardiogram in monkeys treated with gatifloxacin under conscious and nonrestricted conditions. *Exp. Anim.* **62**: 281-290.
110. Yoshioka, T., Ageyama, N., Shibata, H., Yasu, T., Misawa, Y., Takeuchi, K., Matsui, K., Yamamoto, K., Terao, K., Shimada, K., Ikeda, U., Ozawa, K. and Hanazono, Y. 2005. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34⁺ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells.* **23**: 355-364.
111. Yuki, Y., Nochi, T., Harada, N., Katakai, Y., Shibata, H., Mejima, M., Kohda, T., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Ono, F., Kozaki, S., Terao, K., Tsukada, H. and Kiyono, H. 2010. In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J. Immunol.* **185**: 5436-5443.

112. 和賀井敏夫, 超音波診断研究の足跡, 1991. *日消集検誌* **90**: 47-52.