

カニクイザルにおける
心臓ホルモンに関する研究

白 仲玉

日本大学大学院獣医学研究科

(2021)

| | | |
|----|-----------------------------------|--------|
| 1 | 目次 | |
| 2 | | |
| 3 | 第1章 緒論 | pp. 4 |
| 4 | | |
| 5 | 第2章 カニクイザルの心臓ホルモンの基準値 | |
| 6 | 第1節 はじめに | pp. 15 |
| 7 | 第2節 材料及び方法 | pp. 17 |
| 8 | 第3節 結果 | pp. 20 |
| 9 | 第4節 考察 | pp. 26 |
| 10 | 第5節 小括 | pp. 29 |
| 11 | | |
| 12 | 第3章 房室弁逆流が観察されたカニクイザルの心臓ホルモン値の有用性 | |
| 13 | 第1節 はじめに | pp. 31 |
| 14 | 第2節 材料及び方法 | pp. 32 |
| 15 | 第3節 結果 | pp. 34 |
| 16 | 第4節 考察 | pp. 44 |
| 17 | 第5節 小括 | pp. 47 |
| 18 | | |
| 19 | 第4章 先天性心疾患における心臓ホルモン値の有用性の検討 | |
| 20 | 第1節 はじめに | pp. 49 |
| 21 | 第2節 材料及び方法 | pp. 50 |
| 22 | 第3節 結果 | pp. 51 |
| 23 | 第4節 考察 | pp. 64 |
| 24 | 第5節 小括 | pp. 72 |
| 25 | | |
| 26 | | |

| | | |
|---|--------|--------|
| 1 | 第5章 総括 | pp. 73 |
| 2 | | |
| 3 | 謝辞 | pp. 79 |
| 4 | | |
| 5 | 参考文献 | pp. 80 |
| 6 | | |

1

2

3

4

5

6

7

8

9

第 1 章
緒論

1 第1節 循環器システム

2

3 循環器学は内科学の1つの分野で、その語源となる心臓学 (Cardiology)
4 は、文字のように心臓、およびそれに関する血管、血圧などの分野に関する研
5 究である。循環器学が起源になる学説は1628年に William Harvey が提唱した血
6 液循環説が知られる[29]。血液循環説は「血液は心臓から出て、動脈経由で身
7 体の各部を経て、静脈経由で再び心臓へ戻る」という説である。この仮説は現
8 在の循環器学の根幹となった[29]。

9 心臓はおおよそ円錐形で、不随意筋である心筋で構成される。内部は動物種
10 により異なるが、人類を含む哺乳類や鳥類および一部の爬虫類においては左心
11 房、左心室、右心房、右心室と4つの部屋に分かれる。送り出した血液の逆流
12 を防止するため、左心室と左心房の間には僧帽弁、右心室と右心房の間には三
13 尖弁があり、肺動脈弁は右心室と肺動脈の間に、大動脈弁は左心室と大動脈の
14 間にある。心臓の収縮と拡張は、体中に血液を循環させる役割がある。その心
15 臓の収縮には心筋が大きく関わる。

16 心筋は横紋筋であり、近隣の筋線維と接するところでは、境界板によって強
17 く結合されている。心筋の収縮は骨格筋と同様に刺激を受けると活動電位が発
18 生し、T管系にあるL型 Ca^{2+} チャネルを介して Ca^{2+} が流入する。流入した
19 Ca^{2+} が筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャネルに結合し、チャネルを解放させる。その
20 際、筋小胞体に貯蔵されている Ca^{2+} が放出。放出された Ca^{2+} は隣接するリア

1 ノジン受容体に結合し、また Ca^{2+} が放出。放出された Ca^{2+} はトロポニン C に
2 結合し、アクチンとミオシンの相互作用によって心筋が収縮する。
3 Ca^{2+} が筋小胞体に取り込まれ、あるいは Na^{+} - Ca^{2+} 交換系を經由し、 Ca^{2+} 濃度
4 が減少するとトロポニン C と Ca^{2+} の結合が解除され心筋が弛緩する。この心
5 筋の収縮能力は心臓前負荷と後負荷によって調節される。

6 前負荷は拡張終期までに心室に流入した血液量で、容量負荷と言われる。後
7 負荷は心室が血液を送り出すために必要な圧力で、左心系は大動脈圧、右心系
8 は肺動脈圧として知られる。前負荷増大時に、心臓に流れ込む血液が増え、
9 Frank-Starling の法則に従って、心臓の 1 回拍出量も増える。このように慢性的
10 に前負荷がかかると、心拡大、心臓の収縮性も低下する。後負荷が増大した場
11 合、末梢血管抵抗に対抗するため心筋が太くなることで、より強い収縮力を得
12 る。しかし、慢性的に後負荷が持続すると、心肥大や心臓拡張性が低下する。
13 前負荷、後負荷が増加し、心臓の代償機構が追い付けないと心不全へ発展する
14 ことが多い。

15 心臓から血液の拍出を調節するには、様々な液性因子が関わる。その中に心
16 房筋から分泌される、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と心室筋から分泌
17 される脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が心不全の病態を反応する指標とし
18 て、近年ヒト医療で注目されている [45, 51]。

19

20

1 第2節 心臓ホルモン：心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と脳性ナトリウ
2 ム利尿ペプチド(BNP)

3

4 心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の存在は 1956 年 Kisch らが心房筋細胞
5 の顆粒として初めて報告した[28]。1979 年 de Blod らは心房筋内の顆粒は体液
6 量とともに変動することを発見し、1981 年にラットの心房から抽出成功と報告
7 した[28]。ヒトにおいては 1984 年に寒川・松尾らが心不全の患者の心房筋か
8 らラットと同物質を分離と精製に成功し、心房性ナトリウム利尿ペプチドと命
9 名した[45]。

10 ANP は 28 個のアミノ酸よりなるであり、血管の弛緩作用を持ち、末梢血管
11 抵抗と容量血管の血圧を低下させる。主な働きとしては、血管拡張、腎臓での
12 Na の再吸収、アルドステロンの分泌を抑制すると報告された[27, 43]。心不全
13 でレニン・アルドステロン系、交換神経系などが活性化し、血管の収縮や Na⁺
14 の貯留作用を通し、体液量を調整して血圧を維持する。しかし、この体液代償
15 により、心臓の前負荷および後負荷が増大、心機能が悪化する可能性がある。
16 この代償機構を緩和するために、Na 利尿作用、血管拡張作用、レニン-アンジ
17 オテンシン系、抗利尿ホルモン(ADH)、交感神経系を抑制する ANP が分泌さ
18 れる[27, 43]。

19 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は 1988 年にブタ脳から分離され 32 個の
20 アミノ酸より構成される。当初は脳から分離されたため Brain Natriuretic Peptide

1 (BNP) と命名されたが、その後、主に心室筋から分泌することが判明した
2 [25]。BNP も ANP と同様に Na 利尿作用、血管拡張作用、レニン-アンジオテ
3 ンシン系、抗利尿ホルモン (ADH) および交感神経系を抑制するが。ANP が心
4 房筋から分泌・貯蔵されに対し、BNP は貯蔵されることが少なく、常に血中に
5 放出されている。心室筋の伸展に応じその血中濃度が上昇するが[47]、この特
6 性を利用し、ヒト医療での BNP 測定は心不全重症度評価のみならず、心疾患に
7 よる心臓障害の予後判断として使われている[45]。

8 ANP のアミノ酸配列は哺乳類の中で種差がないと報告されているが、BNP
9 のアミノ配列はペプチドホルモンで種差が著しいと知られている[1, 30]。

10

1 第3節 実験用サル類の医学実験利用における歴史

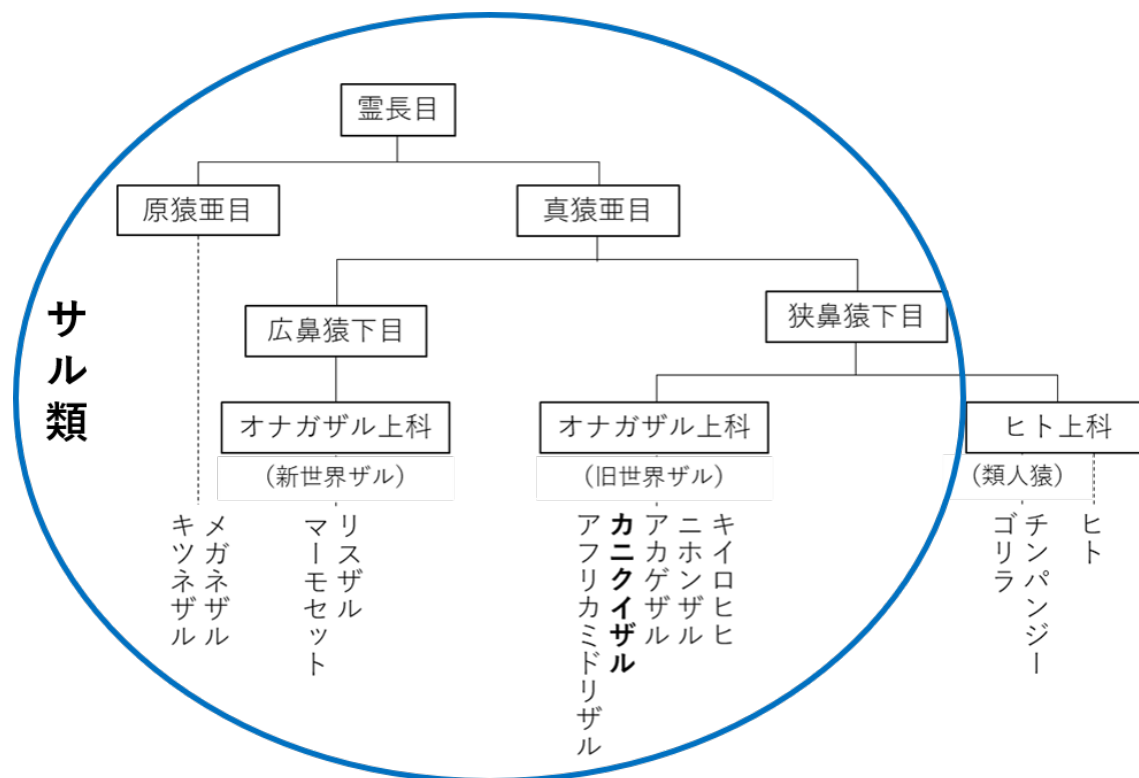
2

3 医学実験、創薬開発を目的とする霊長類センターは1925年にソビエト連邦
4 医学アカデミーがグルジア共和国に建てられたサルの実験飼養場が最初であ
5 る。1926年にアメリカのカーネギー研究所そして1928年にイエール大学にも
6 霊長類センターが設立された。実験用の大規模飼育は、1950年代のポリオワク
7 チン開発がきっかけである。1962年～1965年の間アメリカにおいて7つの国
8 立地域霊長類研究センターが設立された。その後オランダ、西ドイツも相次い
9 で霊長類センターを設立した。日本もポリオの国産ワクチンの安全性を確認す
10 るために1961年から1964年の間に国立予防衛生研究所実験動物第2室に
11 4,477頭のカニクイザルの飼育を開始した。このように、ワクチンの開発がき
12 っかけとなって、マールブルグ感染症やエイズや行動科学、脳神経研究などに
13 実験動物としてサル類を用いられるようになった[2, 9]。

14 サル類とはヒト科を除く霊長目(Primates)に属する動物のことを指す。現存す
15 るものは約220種が知られている。主の生息地域は中南米、アフリカ、南アジ
16 ア、東アジアの熱帯や亜熱帯地域である。サル類はおおまかに原猿類と真猿類
17 に二分される。実験動物としては、真猿類亜目の広鼻猿類(新世界サル)に属す
18 るリスサル、マーモセット、狭鼻猿類のニホンザル、アカゲザル、カニクイザ
19 ルなどの旧世界サルが知られている[54]。ヒトと近縁と知られるチンパンジ
20 ー、ゴリラはヒトと同様に類人猿に分類される。

1 野生のカニクイザルは東南アジアの広い範囲に生息している。特定季節に繁
2 殖する狭鼻猿類マカカ属にいるアカゲザル、ニホンザルと違い、カニクイザル
3 の繁殖は通年で行われる。マカカ属の中では最も小型のサルであるため、日本
4 においては実験用サルとして用いる。現在日本の実験用カニクイザルコロニー
5 はインドネシア、フィリピン、マレーシア 3 つ地域から導入され継代されてい
6 る [54]。

1
2
3



5 Fig. 1 サル類の分類の概略と主要な種名 [Yoshida, T. and Fujimoto, K. 医科学研究資

6 源としてのカニクイザル, 2006.より改変]

1 第4節 循環器研究におけるサル類の役割と現状

2

3 1940年代、実験用霊長類の必要性が徐々に高まるとともに、冷戦状態が緩和
4 したアメリカとソビエト連邦との研究交流が始まった。1956年アメリカ国立衛
5 生研究所(NIH)国立心臓研究所の所長 James Watt が3節に述べたソビエト連邦
6 医学アカデミーがグルジア共和国に建てられたサルの実験飼養場を視察した。
7 実験飼養場に行われたヒヒの高血圧に関する実験を見学した後、心臓血管研究
8 には霊長類研究センターの設立が必要と考え、アメリカ政府に勧告し、1965年
9 前後に7つの国立地域霊長類研究センターが設立された。その後、心臓血管の
10 みならず、ヒト医学において多くの領域にも実験用サル類が用いられた
11 [2, 19]。

12 前の章に述べたように、サル類を用いた医学研究は第二次世界大戦前後開
13 始されたため、マウスなどの実験動物と比べるとまだ歴史が浅い。しかし、ヒ
14 トと近縁の動物で、また、飼育下の寿命が30年ほど長寿であるため、ヒトで
15 みられたがんや慢性疾患、循環器疾患も発生する[3, 4, 54]。近年サル類におけ
16 る循環器研究が進んでおり[3, 40, 41]、日本にもカニクイザルを用いて iPS 細胞
17 を作製し、心筋細胞の移植試験を試みたと報告があり、循環器再生医療にも積
18 極的にサル類の研究を行っている[2, 19]。一方、ヒト医学の外挿モデルとして
19 注目されるが、サル類の循環器に関する知見がまだ確立されていない部分が多
20 い。本研究では循環器診断においてその心不全の進行や予後判定に幅広く使わ

- 1 れている心臓ホルモン、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と脳性ナトリウ
- 2 ム利尿ペプチド(BNP)がカニクイザルにおいて有用性を確立し、循環器疾患に
- 3 おける臨床応用の可能性について検討を行った。

1

2

3

4

5

6

7

第2章

8

カニクイザルの心臓ホルモン基準値

1 第1節 はじめに

2

3 ヒトおよび動物の身体状態を評価するために行われる血液化学検査には様々
4 な項目があり、腎臓、肝臓などの内臓機能評価に有用性が高い。近年ヒト医療
5 では、心臓ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と脳性ナトリ
6 ウム利尿ペプチド(BNP)が注目されている。ANP 値と BNP 値は現在ヒト医療現
7 場で、心臓容量負荷評価、心肥大また心筋障害、心筋梗塞などの予後評価に応
8 用されている [39, 42, 47]。

9 ANP, BNP は 1980 年代から体液量を調節するホルモンとして知られており
10 [37, 53]。ANP は重篤な心疾患に対して治療薬としても用いられる。ANP は主に
11 心房筋から分泌され、血管内皮細胞、平滑筋細胞、心線維芽細胞の増殖を抑制
12 し、レニン・アンギオテンシン・アルドステロンの分泌、活性を抑制、血管収
13 縮性因子と拮抗することで体液量を調節する。そのため、心不全の状態に陥る
14 と、ANP が血中に放出され、体液循環の代償で心臓の前・後負荷を増大させ、
15 心機能がさらに低下する場合がある [37, 39]。BNP は主に心室筋で産生され、左
16 室拡張機能低下や心筋障害、心室負荷などを反映するため、有用な心不全マー
17 カーと考えられている [16, 20, 33, 45]。すなわち、主に心房筋から分泌される
18 ANP は心房前負荷の指標で、主に心室筋で分泌された BNP は左室前負荷、ま
19 たは左室機能障害の指標となり、心不全の診断や重症度の評価また予後評価な
20 どに使われている [55]。

1 このように、心臓ホルモンは生体における心負荷の重症度を反映することか
2 ら、心疾患の重症度、予後評価だけではなく、健康診断における心臓容量負荷
3 評価、心筋障害などの心疾患のリスクスクリーニング検査にも有用と考えら
4 れ、幅広く利用されている[16, 20, 37]。これらの心臓ホルモンは実験動物とし
5 てのサル類において同様の役割を担っていると予想されるが、正常時のホルモ
6 ン量は不明であった。

7 そこで、本章では日本において実験用サル類として頻繁に用いられるカニク
8 イザルを対象に、実験用繁殖コロニーの個体における心臓ホルモン値を測定
9 し、各種心疾患の診断指標となる基準値の推定を試みた。

10

1 第2節 材料および方法

2

3 供試動物

4 本研究で対象としたカニクイザルは、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・
5 栄養研究所 霊長類医科学研究センター（つくば市）において飼育・繁殖され
6 ている個体である。事前健康診断の血液スクリーニングで全血球計算、血液化
7 学検査で異常が認められなかったオス 35 頭およびメス 79 頭の計 114 頭を供試
8 した。

9 これらの個体は結核、赤痢、麻疹、B ウイルス症などの感染症予防、期待さ
10 れない妊娠、または闘争防止のため、すべて幅 50cm、奥行き 86cm、高さ 80cm
11 の個別ケージ内で飼育された。

12 飼育環境に関して、室温は夏季に $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、冬季に $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は通年 50～
13 60%を維持し、換気は毎時 12 回、照明時間はタイマーによる 7 時点灯、19 時
14 消灯の 12 時間とした。餌は 1 日あたり固形飼料 70g と嗜好性 200 g の果物(り
15 んご、バナナなど)を給餌し、飲水は自由とした。

16 またヒト疫学においてエストロゲンにより心臓ホルモンの値に差が出る報告
17 があるため、カニクイザルは全て性成熟が確定した 5 歳以上の個体を用いた
18 [54]。

19 なお、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
20 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

1 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
2 [21, 22, 24]。

3

4 サンプルの採取およびホルモン値測定

5 採血時は塩酸ケタミン (5-10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファー
6 マ, 東京) 鎮静下にて仰臥位に保定し、大腿動脈あるいは大腿静脈より血液を
7 採取した。

8 採取した血液は直ちに EDTA 処理し、4°C, 3,000rpm で 10 分冷却遠心して、
9 測定に供した。直ちに測定できない場合は冷凍保存し、測定時 15–25°C に戻
10 し、速やかに測定した。ホルモン測定には、ANP はヒト用 E test TOSOH II ANP
11 キット(TOSOH Corp., Tokyo, Japan)を使用した。

12 本キットは高親和性抗 ANP マウスモノクローナル抗体を用いた 1 ステップ
13 サンドイッチ蛍光酵素免疫測定法に拠っており、ANP の C 末端部位及び環状構
14 造部位を認識する 2 種類のモノクローナル抗体が形成する免疫複合体を利用
15 し、抗原抗体反応の後、酵素基質として 4-メチルウンベリフェリルリン酸を
16 添加し、得られる蛍光物質(4-メチルウンベリフェロン)の生成速度を測定する
17 ことにより、検体中の ANP 濃度を測定する。BNP はヒト用 E test TOSOH II BNP
18 キット(TOSOH Corp., Tokyo, Japan)を使用した。本キットもヒト用 E test TOSOH
19 II ANP キットと同様に BNP の C 末端部位及び環状構造部位を認識するマウス
20 抗 BNP モノクローナル抗体を用いた 1 ステップサンドイッチ 蛍光酵素免疫測

1 定法である。いずれのキットを用いた反応後は全自動エンザイムイムノアッセ
2 イ装置 AIA-360 及び AIA-900 (TOSOH Corp.)を用いて各濃度を測定した。
3
4 統計処理
5 得られた結果は年齢、性別および体重について統計解析を行った。性別間の
6 差については χ^2 検定により、体重と加齢性の変化については検体数が 30 検体
7 を超えていたため、母集団が正規分布であると想定し、Student t 検定を用いて
8 相関を検討した。相関係数の算出については Pearson's product moment
9 correlation coefficient を用いた。統計分析には IBM SPSS Statistic Software (IBM
10 SPSS, Turkey)を用いた。すべての結果について、p 値が 0.05 以下の場合に有意
11 差ありとした。

1 第3節 結果

2

3 今回対象としたカニクイザルの年齢及び体重はオス 35 頭平均年齢が 9.4 ± 5.4
4 歳、平均体重が 5.14 ± 1.10 kg で、メス 79 頭平均年齢が 15.7 ± 6.6 歳で、平均体
5 重が 4.03 ± 1.03 kg であった(Table 1)。性別と年齢、体重に χ^2 検定を行い、有意
6 差が認められなかった($p > 0.05$)。

7

8 心臓ホルモン値検査

9 心臓ホルモンの平均値および標準偏差は、ANP では 20.71 ± 13.52 pg/ml, BNP
10 は 2.36 ± 2.23 pg/ml であった(Table 2)。なお性差は認められなかった
11 ($p > 0.05$)(Table 3)。

12 加齢性と ANP 値との相関係数が 0.153 であり、BNP 値との相関係数は 0.136
13 であった。ANP および BNP 値ともに 1%水準で $p > 0.05$ のため、心臓ホルモン
14 値と年齢の相関は認められなかった。

15 体重と ANP 値との相関係数は -0.041 であり、BNP 値との相関係数は 0.136
16 であった。1%水準で $p > 0.05$ のため、心臓ホルモン値と体重との相関は認めら
17 れなかった。

18 また個体の年齢(Fig. 2)及び体重(Fig. 3)いずれも心臓ホルモン値との相関は認
19 められなかった。

20

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Table 1 供試されたカニクイザルの体重及び年齢

| | n | Body Weight (kg) | Age (years old) |
|--------|----|------------------|-----------------|
| Male | 35 | 5.14 ± 1.10 | 9.4 ± 5.4 |
| Female | 79 | 4.03 ± 1.03 | 15.7 ± 6.6 |

* mean ± SD

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Table 2 カニクイザルにおける心臓ホルモンの平均値

| | n | pg/ml |
|-----|-----|--------------|
| ANP | 114 | 20.71 ±13.52 |
| BNP | 114 | 2.36 ± 2.23 |

* mean ± SD

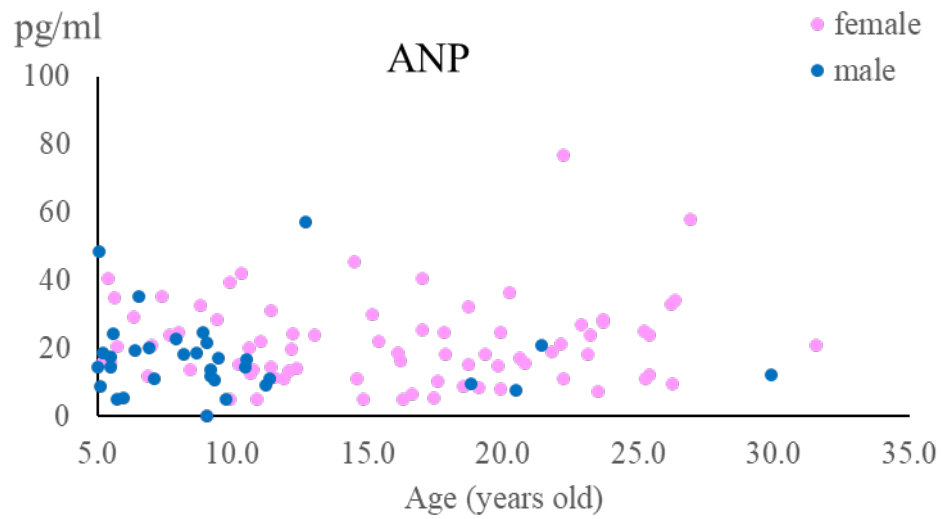
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Table 3 カニクイザルの雄雌別の心臓ホルモンの平均値

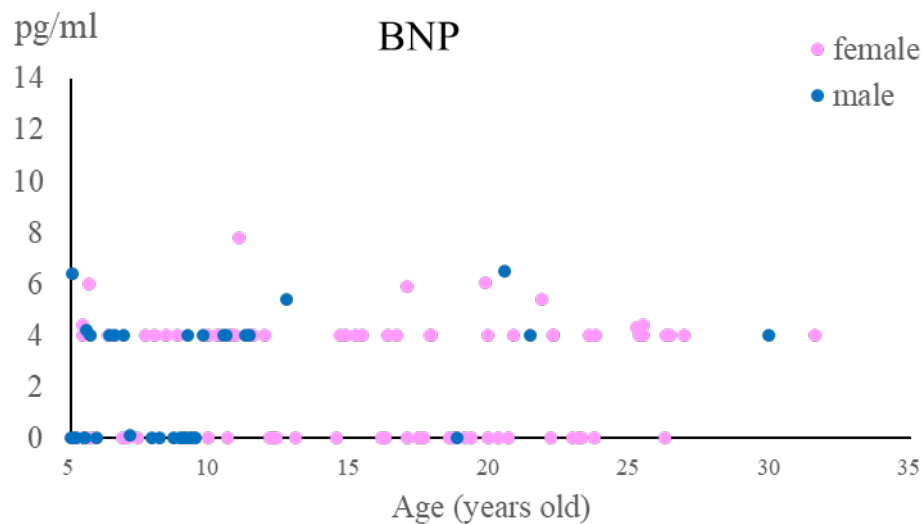
| | n | ANP (pg/ml) | BNP (pg/ml) |
|--------|----|--------------|-------------|
| Male | 35 | 19.43 ±15.67 | 2.30 ± 2.29 |
| Female | 79 | 21.27 ±12.41 | 2.39 ± 2.20 |

* mean ± SD, *p>0.05

1



2



3

4 Fig. 2 年齢における心臓ホルモン値の相関(上: ANP、下: BNP)

5 心臓ホルモン値 (ANP, BNP) は年齢との相関を認められなかった。 ($p>0.05$)

6

7 *ヒト用 BNP キットの検出限界が 4 pg/ml, 本研究は検出限界に達してなかった
8 個体の BNP 値を 0.01(<4) pg/ml とした[10]。

9

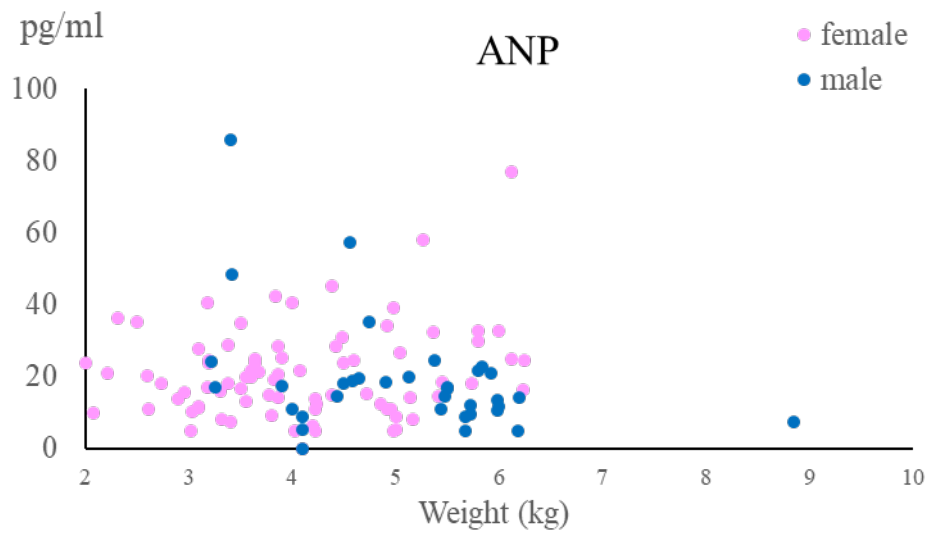
10

11

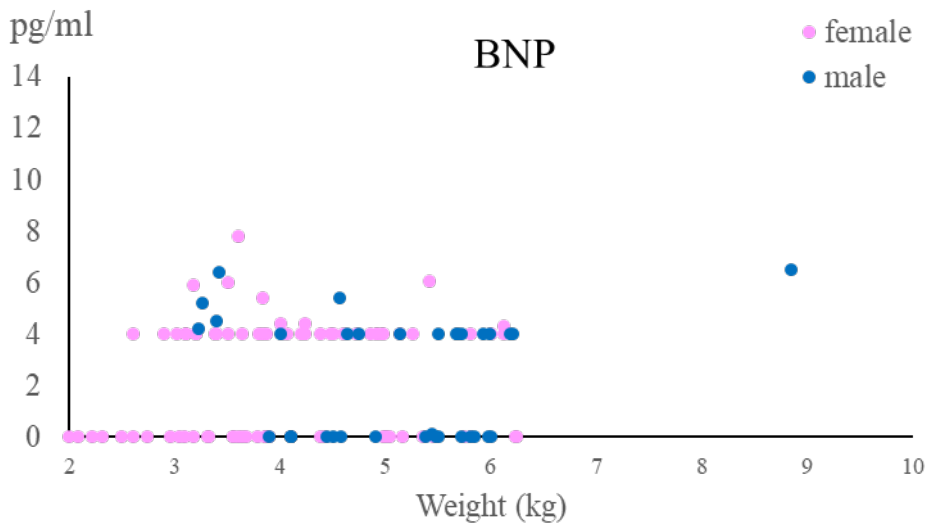
12

13

14



1



2

3

4 Fig. 3 体重における心臓ホルモン値の相関(上: ANP、下: BNP)

5 心臓ホルモン値 (ANP, BNP) は体重との相関を認められなかった。(p>0.05)

6

7 *ヒト用 BNP キットの検出限界が 4 pg/ml, 本研究は検出限界に達してなかった
8 個体の BNP 値を 0.01(<4) pg/ml とした[10].

9

1 第4節 考察

2

3 本章ではカニクイザルの心臓ホルモン(ANP, BNP) の基準値の参考となる 100
4 頭規模の平均値をはじめて報告した。これまでに、断片に心筋症などの心疾患
5 を罹患した個体の心臓ホルモン値の報告はあるが、正常個体における心臓ホル
6 モン値の検討を行った初めての研究である。心臓ホルモンは、ヒト医療には心
7 不全ステージの評価、予後判断または健康診断のスクリーニングの指標であり
8 [39, 51]、実験動物としてのサル類の心臓ホルモン値基準値の樹立は動物福祉
9 向上の観点においても不可欠な項目である。本報では性成熟以降の個体の心臓
10 ホルモン値を測定し、性別、年齢、体重による差の有無にも検討し、得られた
11 結果は実験用サル類の基準値となると考えられる。

12

13 心臓ホルモン値について、健康なヒトの心臓ホルモン値の定義は ANP : 43.0
14 pg/ml 以下で、BNP : 18.4 pg/ml 以下と報告される[51]。ヒトにおける BNP に
15 ついては 18.4 pg/ml の場合に軽度な心不全のリスクがあり、精密検査を推奨さ
16 れる[51]。今回健康なカニクイザルの心臓ホルモン値は両方ともヒトの健康値
17 を下回った結果になった[34, 51]。これは健康なカニクイザルの特性と考える
18 が、今回使用した心臓ホルモン値測定キットはヒト用のもので、抗体の反応が
19 ヒトより劣る可能性もある。また BNP は動物において種差が激しいが、サル
20 類用 BNP キットがまだ存在しない。今回 BNP のアミノ酸配列が 97%相同と報
21 告されたヒト用 BNP キットを用いたがこちらが結果に影響を与えることも考
22 えられる[1]。今後は測定キットの感度を検証すべく、抗体が N 末端に結合す
23 る心臓ホルモン測定キットの使用を考慮したいと考えている。

1 本研究に試供されたコロニーは定期的な健康診断を実施しており、異常のな
2 い個体を使用していることから腎臓疾患などのレニン-アンジオテンシン系ま
3 た甲状腺疾患による影響が低いと考えられる。

4 ヒトでは、女性の ANP と BNP が男性より有意に高いとの報告があるが
5 [12]、飼育されるカニクイザルではこの傾向がみられなかった。ANP において
6 はヒトの女性のエストロゲンの影響で高値を示し、BNP においてはテストステ
7 ロンの関与で男性が低値を示すことが知られている[12, 17, 34, 44]。本研究で
8 は、ヒトと異なる結果となった。メスのエストロゲンの分泌量は生理周期によ
9 って異なり、本研究は性成熟の個体を対象としており、黄体ホルモン値の測定
10 は測定を実施しなかったため、今後採血時、生理周期のステージを把握し
11 て、心臓ホルモンの評価を行う必要がある。オスでもテストステロンを測定必
12 要があると思われる。

13 心臓ホルモンの分泌が少ない場合、心筋の線維化は進むと報告がある[50]。
14 加齢性の変化については、ヒトでは壮年期から老齢期にかけて、心臓の線維化
15 が進み、心臓ホルモン ANP, BNP が上昇すると報告された[44]。しかし、カニ
16 クイザル群ではこの傾向が観察されなかった。ヒトにおいても環境因子などの
17 バイアスがあり、まだ正確な機序が解明されていないが、我々は次のような考察
18 を行った。サル類にもヒトと同様に加齢に連れて心臓の線維化が進行すると考
19 えられるが、ケージ内飼育であるため、ヒトとは異なり運動負荷がかからない
20 環境も関与していると思われる。このような環境から心拍数または心臓の収縮
21 が急激に増加することが少ないため、心臓ホルモン値の差が出にくいと思われ
22 た。

23 体重と ANP, BNP 値との相関は認められなかった。ヒトにおいては肥満細胞
24 に多く存在するクリアランスレセプター (Natriuretic peptide receptor-C, NPR-

1 C)、あるいは脂肪細胞から分泌された中性エンドペプチダーゼ (Neutral
2 endopeptidase, NEP) が BNP を分解し、肥満者における BNP 値が低く測定され
3 ると報告されている [23, 38, 52]。カニクイザルでは、まだ脂肪細胞における
4 NPR-C の報告がないため、機序は不明であるが、脂肪細胞における NPR-C の
5 数による違いや、体重増加に伴う循環血液量の増加により心負荷が増大した可
6 能性が示唆される。

7 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
8 に飼育されるカニクイザルは多くの医科学研究に用いる。確立された基準値
9 は、日本国内実験用サル類の基準になるだけでなく、動物園に飼育されるサル
10 類における血液スクリーニング、あるいは海外のサル類循環器研究においても
11 貢献すると思われる。また、ヒトでみられた加齢性と体重における心臓ホルモ
12 ン値の変化はみられなかったが。サル類に特有の傾向であるか否か、ヒトと異
13 なる点を検討し、得られた結果は実験動物ならびにサル類の動物福祉向上に有
14 用なデータとなるとと思われる。

15

1 第5節 小括

2

3 本研究はカニクイザル繁殖コロニーにおける健康なカニクイザルの心臓ホル
4 モン(ANP, BNP)基準値を確立した。

5 本章では飼育された健康なカニクイザルの心臓ホルモン値 ANP : $20.71 \pm$
6 13.52 pg/ml で、BNP : 2.36 ± 2.23 pg/ml を得られた。またオスとメスの性差は認
7 められなかった、加齢性および体重による心臓ホルモンの増加は認められなか
8 った。この結果は、ヒトとは異なるが、今後について検体数をさらに増やし、
9 類似した結果を得られるかを検証して行きたいと考えている。

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1

2

3

4

5

6

7

第3章

8

房室弁逆流が観察されたカニクイザル

9

の心臓ホルモン値の有用性

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 第1節 はじめに

2

3 弁膜症はヒトおよび動物の臨床において非常に多く観察される慢性心疾患で
4 ある。その定義は、弁の開放、閉鎖が障害され、心臓の容量負荷が上昇し、心
5 筋機能または血液拍出機能が低下する、不完全な弁の閉鎖により心室の収縮期
6 に血液が心房へ逆流するにより [48]、代表的なものは僧帽弁閉鎖不全症(Mitral
7 Regurgitation, MR)と三尖弁閉鎖不全症(Tricuspid Regurgitation, TR) であり、高齢
8 のカニクイザルに比較的多い。

9 僧帽弁閉鎖不全症は収縮期に左室から左房に向かって血液が逆流する病態を
10 示す。収縮期に左室から左房への血液が逆流し、拡張期に左室への還流血液が
11 増えるため、左房と左室の拡張がおこる [48]。三尖弁閉鎖不全症は右室から右
12 房に血液が逆流し、容量の上昇により右房の拡大をきたし、体液調整機能によ
13 る容量負荷の増大から、右室の拡大も観察され、重症度が進むと右心不全に陥
14 る可能性もある [51]。ヒト医療のみならず、イヌ、ネコの獣医療現場におい
15 て心臓ホルモン値 ANP, BNP 値を用いて心臓容量負荷、心筋障害を評価する場
16 合もある [7]。

17 本研究は、慢性心疾患を罹患したカニクイザルと健康なカニクイザルにおけ
18 る心臓ホルモン値を比較し、ヒト医療と同様に心臓ホルモン値のスクリーニン
19 グマーカーとしての可能性を検討した。

20

21

22

23

24

1 第2節 材料および方法

2

3 供試動物

4 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
5 (つくば市)において飼育・繁殖されているカニクイザル57頭(オス22頭お
6 よびメス35頭)を用いた(Table 4)。これらの飼育管理はすべて2章と同様に
7 実施した。

8

9 弁膜症個体の抽出

10 健康診断の際に心雑音が聴取された個体にまたは心エコー図検査を実施し、
11 僧帽弁あるいは三尖弁に逆流が観察された個体を用いた、心エコー図検査には
12 日立アロカ超音波診断装置 ProSound α 7systems (Hitachi Healthcare Manufacturing
13 Co., Ltd., Kashiwa, Japan)を使用した。

14

15 サンプルの採取およびホルモン値測定

16 塩酸ケタミン鎮静下(5-10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファーマ,
17 東京)にて仰臥位に保定し、大腿動脈あるいは大腿静脈より血液を採取した。

18 採取した血液は直ちにEDTA処理し、冷却遠心分離した。直ちに測定できな
19 い場合は血漿を冷凍保存し、測定時15-25°Cに戻し、速やかに測定を行った。

20 ANPはE test TOSOH II ANPキット(TOSOH Corp., Tokyo, Japan)、BNPはE test
21 TOSOH II BNPキット(TOSOH Corp., Tokyo, Japan)を使用した。分析は全自動エ
22 ンザイムイムノアッセイ装置AIA-360及びAIA-900(TOSOH Corp.)を用いて測
23 定した。

24

1 病理組織学的検査

2 重度な僧帽弁閉鎖不全症個体は予後不良と判断し安楽死させた。心臓を矢状
3 断に切り出し、10%中性緩衝ホルマリン液に固定し、組織を 5 μm の厚さに薄切
4 した。その後、マッソントリクローム(MT)染色を行った。作製した切片を
5 BX51 顕微鏡で観察し、DP71 CCD カメラ(Olympus, Tokyo, Japan)で撮影した。

6

7 統計解析

8 得られた結果は、MR, TR, MR・TR の 3 群に分けて、健康群と Kruskal-Wallis
9 検定法を行い、その後 Steel-Dwass 検定法で多重比較を実施した。統計分析に
10 は IBM SPSS Statistic Software ((IBM SPSS, Turkey)と R commander (ver. 2.3-0)を
11 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
12 [Kanda, 2013]。すべての結果について、p 値 0.05 以下を有意差ありとした。グ
13 ラフデータには表計算ソフト(Microsoft Office Excel 2019; Microsoft Corporation,
14 Redmond, WA, USA)を使用した。また、ANP, BNP のカットオフ値、感度および
15 特異度を決定する ROC 曲線に関しては、Youden index を使用し、ソフトウェア
16 は 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
17 ンター、埼玉) を用いた[Kanda, 2013]。

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 第3節 結果

2 房室弁の逆流が観察されたカニクイザルの年齢及び体重はオス 22 頭平均年
3 齢が 12.2 ± 8.6 歳、平均体重が 5.43 ± 1.25 kg で、メス 35 頭平均年齢が $17.9 \pm$
4 5.9 歳で、平均体重が 4.08 ± 1.00 kg であった(Table 4)。

5 房室弁の逆流が観察されたカニクイザルの心臓ホルモン値は平均値および標
6 準偏差について ANP は 45.03 ± 59.40 pg/ml で BNP は 15.06 ± 35.99 pg/ml であ
7 った。MR と TR の病態が異なるため、グループ分けて検討を行った。内訳お
8 よび心臓ホルモン値の中央値は僧帽弁閉鎖不全症群 (MR) 32 頭の中央値とい
9 は、ANP は 24.90 pg/ml で、BNP は 4.00 pg/ml であった。三尖弁閉鎖不全症群
10 (TR)16 頭の中央値については、ANP は 32.50 pg/ml, で、BNP は 4.0 pg/ml であつ
11 た。僧帽弁閉鎖不全症と三尖弁閉鎖不全症を併発した群 (MR・TR) 9 頭の中
12 央値については、ANP は 31.00 pg/ml で、BNP は 5.4 pg/ml であった(Table 5)。

13 健康なカニクイザルと弁膜症群を MR, TR, MR・TR の 3 群を Kruskal-Wallis
14 検定法を用いて相関を検討した結果、MR 群および MR・TR 併発群の心臓ホル
15 モン ANP 値, BNP 値ともに健康群より有意に高値を示した (ANP: $p=0.001$; BNP:
16 $p=0.0004$; $p<0.05$)。また、各グループにおいて多重比較法は Steel-Dwass 検定を
17 行った結果、ANP と BNP 値は健康群と MR 群と健康群と MR・TR 併発群にお
18 いて有意差が認められた ($p<0.05$) (Fig. 4, Fig. 5)。

19

20 感度と特異度

21 また、診断能の検討については 2 章で使用した健康個体と本章で使われた房
22 室弁逆流が観察された個体のデータを用いて ROC 曲線を描き、Youden index を
23 用いて、算出した。ANP 値が 24.9 pg/ml 時に、最大感度 59%、特異度 76% で
24 あり (Fig 6)、ROC 曲線の下面積 (AUC) が 0.691 であった。BNP 値は 4.3 pg/ml 時

1 に、最大感度 45%、特異度 89%であり (Fig 7)、ROC 曲線の下面積(AUC)が
2 0.667 であった。

3

4 解剖検査及び病理組織学的検査に関しては、僧帽弁閉鎖不全症が重度に進行
5 し、予後不良と診断されたカニクイザルを用いた。本症例の ANP 値は 173
6 pg/ml で、BNP 値は 253.28 pg/ml を示した。心臓エコー図検査では、逆流速
7 度: 4.2 m/s、圧較差: 69.5 mm Hg が観察された(Fig.8)。肉眼解剖では左心室肥
8 大、組織の線維化が観察され、顕微鏡下で、左心室の重度な線維化が観察され
9 た(Fig. 9)。

10

Table 4 供試動物の体重及び年齢

| | n | Weight (kg) | Age (years old) |
|--------|----|-------------|-----------------|
| Male | 22 | 5.43 ± 1.25 | 12.2 ± 8.6 |
| Female | 35 | 4.02 ± 1.00 | 17.9 ± 5.9 |

* mean ± SD

Table 5 房室弁の逆流のカニクイザルにおける心臓ホルモンの中央値

| | n | ANP (pg/ml) | BNP (pg/ml) |
|-------|----|-------------|-------------|
| MR | 32 | 24.90 | 4.0 |
| TR | 16 | 32.5 | 4.0 |
| MR&TR | 9 | 31.00 | 5.4 |

* median

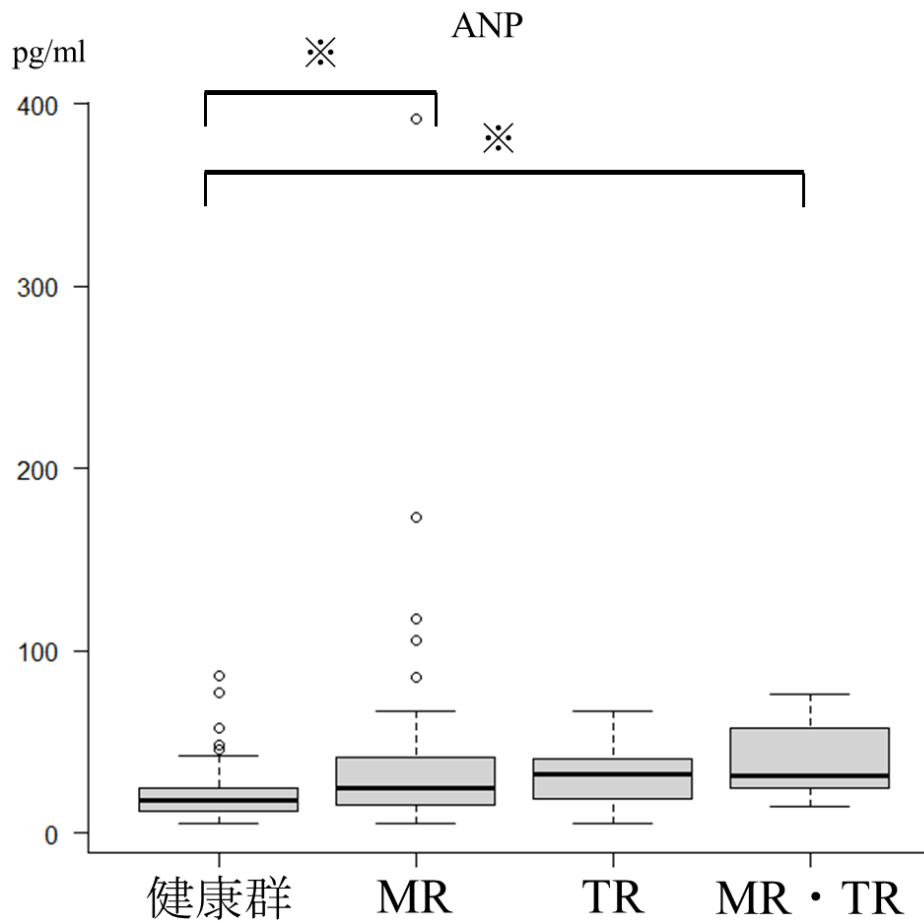


Fig. 4 健康なカニクイザルと房室弁逆流のカニクイザルの ANP 値の比較

房室弁逆流群の心臓ホルモン ANP 値は健康群より有意に高値を示した

($p=0.001$)。ANP 値は健康群と MR 群及び健康群と MR・TR 併発群において有

意差が認められた。※ $p<0.05$

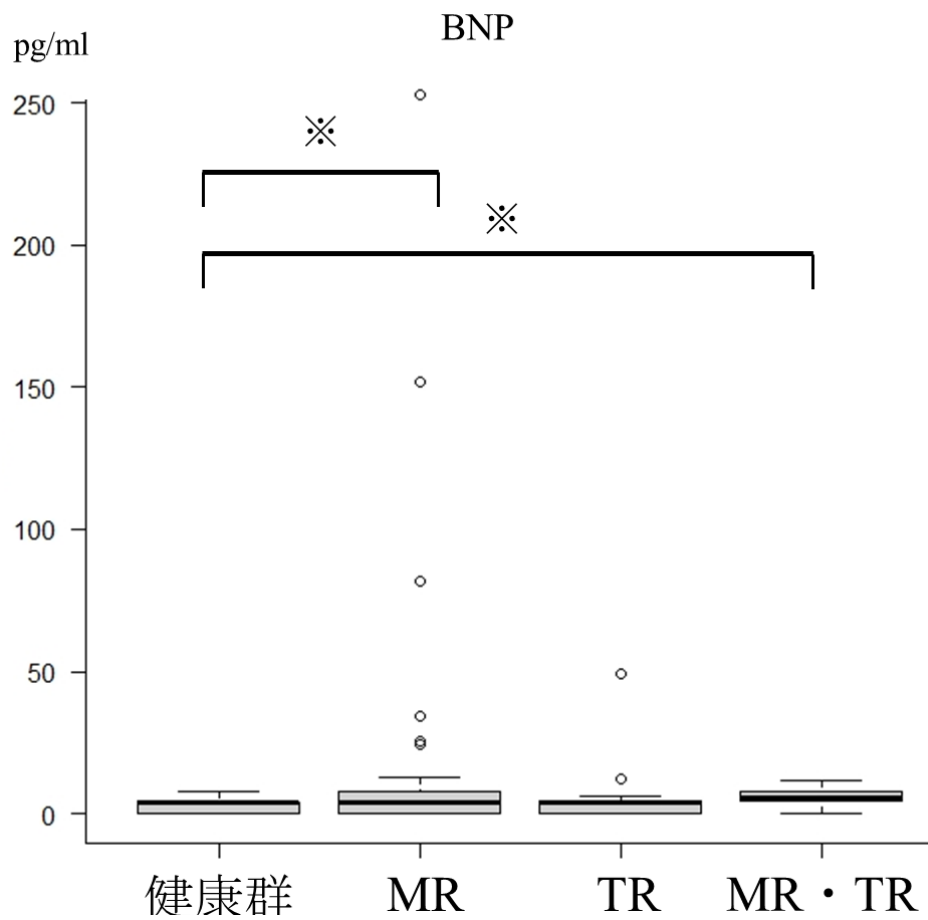


Fig. 5 健康なカニクイザルと房室弁逆流のカニクイザルの BNP 値の比較

弁膜症群の心臓ホルモン BNP 値は健康群より有意に高値を示した($p=0.0004$)。

ANP 値は健康群と MR 群及び健康群と MR・TR 併発群において有意差が認め

られた。※ $p<0.05$

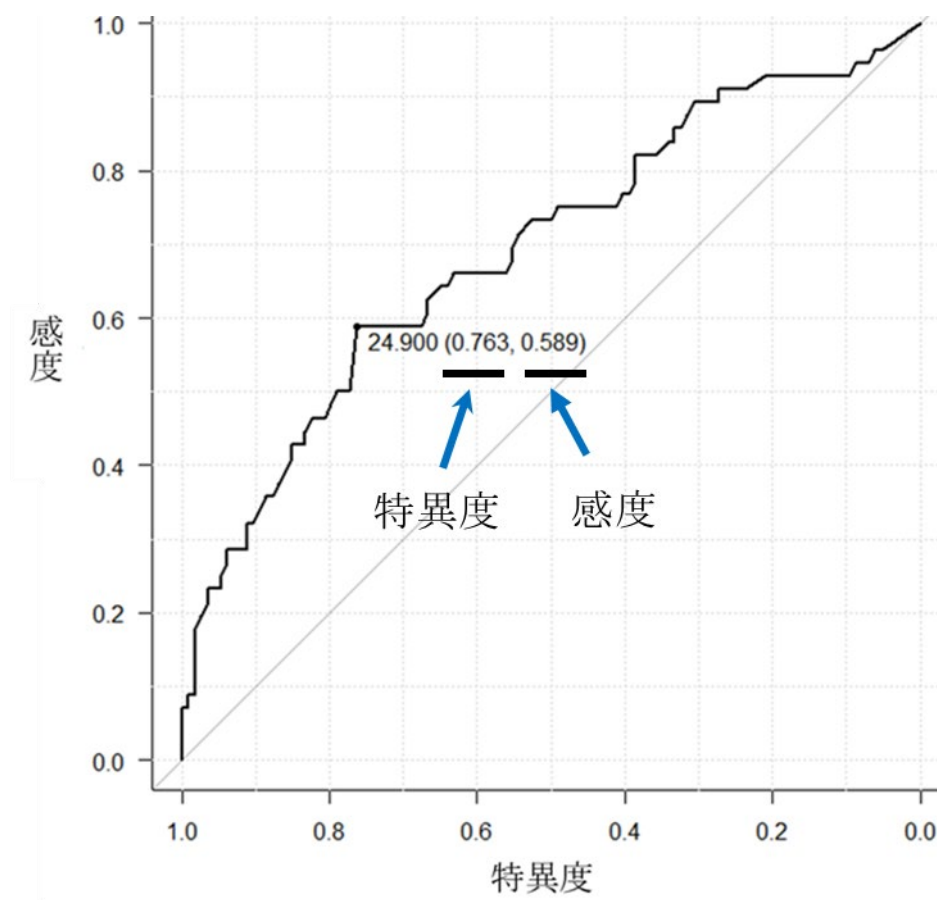


Fig. 6 ANP のカットオフ値

健康なカニクイザルおよび房室弁逆流群に属するカニクイザル ANP 検査の ROC 曲線を算出した。Youden index を用いて、ANP 値 : 24.9 pg/ml 時に、最大な感度 59%、特異度 76%であった。ROC 曲線の下面積 (AUC) が 0.691 であった。

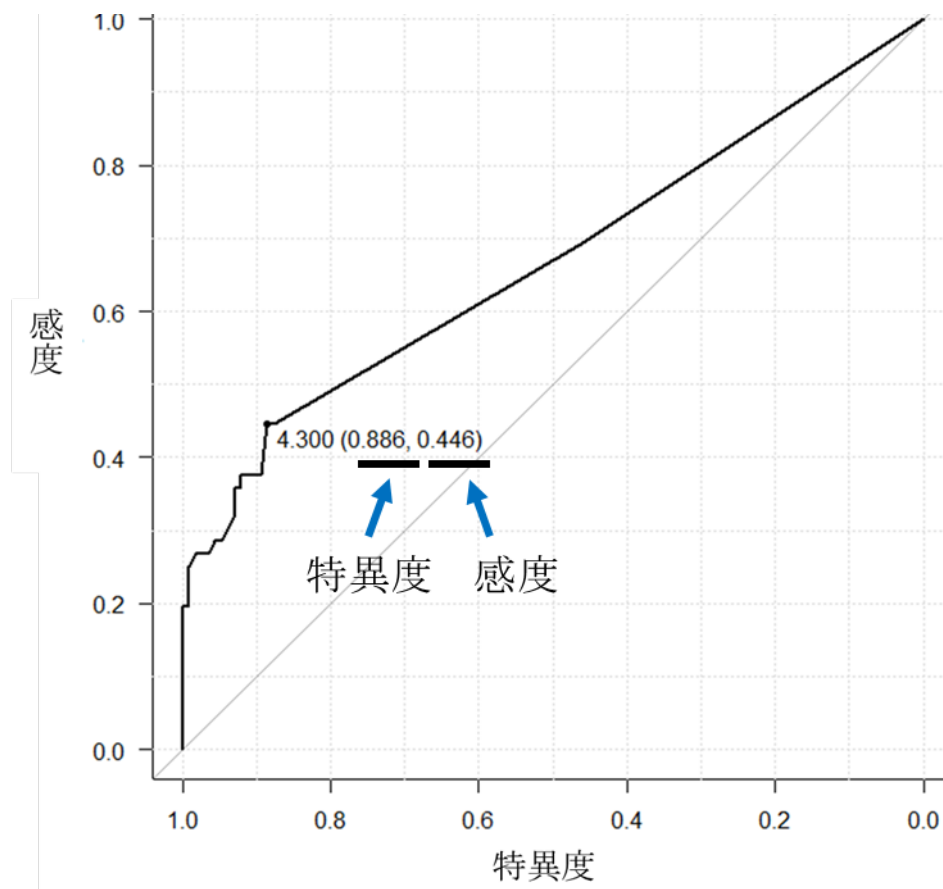


Fig. 7 BNP のカットオフ値

健康なカニクイザルおよび房室弁逆流に属するカニクイザル BNP 検査の ROC 曲線を算出した。Youden index を用いて、BNP 値 : 4.3 pg/ml 時に、最大な感度 45%、特異度 89%であった。ROC 曲線の下面積(AUC)が 0.667 であった。

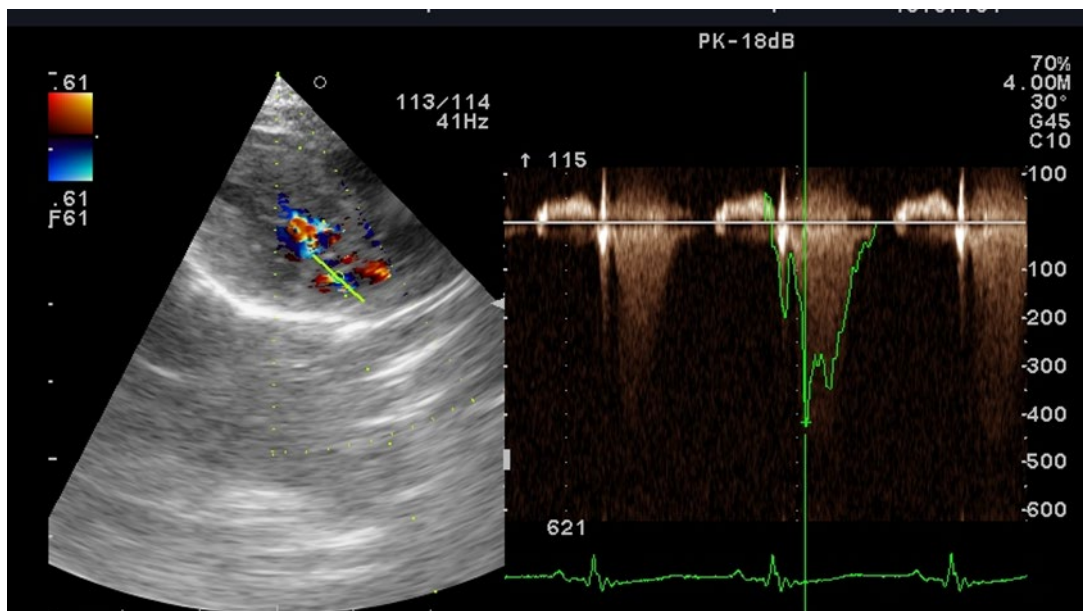


Fig. 8 重度な弁膜症を罹患したカニクイザルの心エコー図

逆流速度：4.2 m/s、圧較差：69.5 mm Hg

本症例の ANP 値は 173 pg/ml, BNP 値は 253.28 pg/ml を示した。

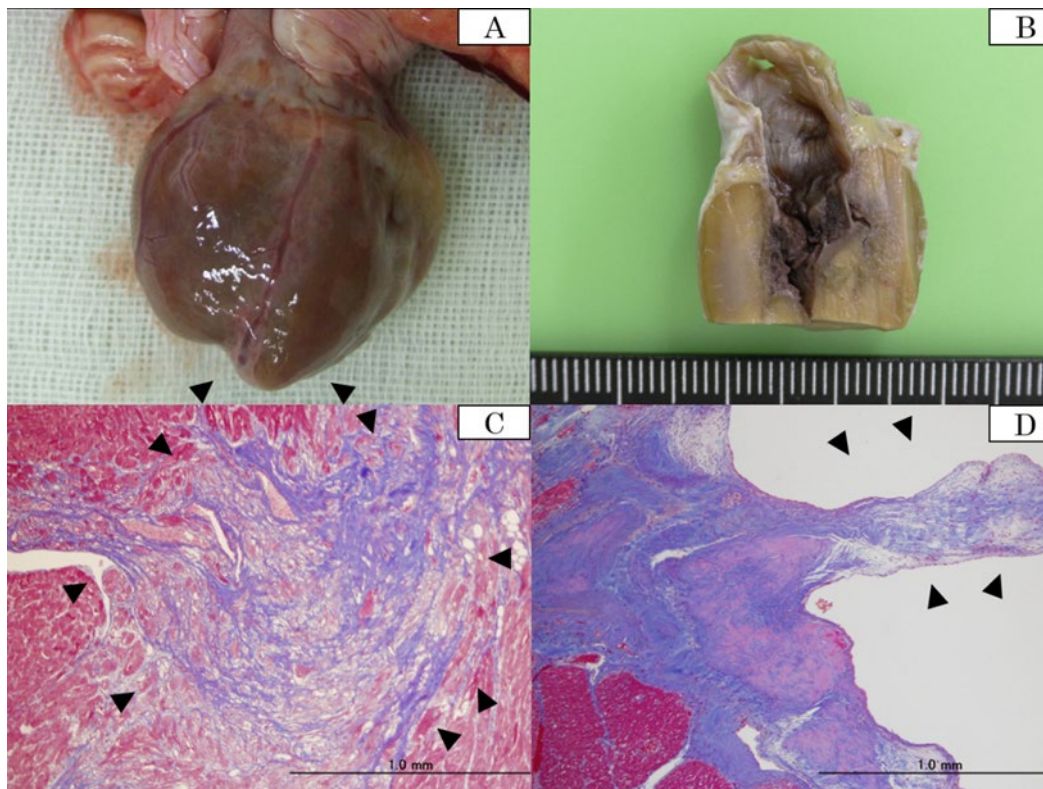


Fig. 9 重度な弁膜症を罹患した個体の肉眼解剖所見と病理組織学的検査 (Fig.8
の心エコー図と同個体)

A : 左心室の肥大 (矢頭)

B : 矢状断面に組織の線維化が観察された。

C, D : 左心室の重度な線維化(矢頭)。

第4節 考察

第2章で得られた健康カニクイザルの基準値と比べ、MR群およびMR・TR群の心臓ホルモンは有意に高値を示した。カニクイザル心臓ホルモン値は弁膜症による容量負荷増大から心房筋伸展による血漿中 ANP の増加、および心室の拡張および心室筋の伸展により血漿中 BNP 値の増加傾向がみられた [25, 39]。心臓ホルモン値はヒト医療においては、心疾患の進行度および重症度など心不全ステージの評価、または予後判断に重要な判断材料である [25, 26]。他の実験動物より長寿で慢性心疾患が発生するサル類における心臓ホルモン測定は、動物福祉向上の観点においても心臓の容量負荷および心筋の伸展や線維化などを評価するに不可欠な項目と考える。

房室弁逆流群の中に、MR群およびMR・TR群のカニクイザルの心臓ホルモン値は、第1章で得られた健康なカニクイザルの心臓ホルモン値と比べると有意に高値を示した。これは、ヒトの報告と同様である [46]。従って、カニクイザルにおける心臓ホルモン値の測定は、ヒトと同様に心臓の容量負荷、心室障害および心筋伸展の評価が可能だと思われた。

また、Steel-Dwass 検定を行った結果、健康群と有意差を示した群はMR群とMR・TR群であった。左心房容量負荷の増加及び左心房と左心室の心筋伸展が原因と思われた。MR・TR群において、心臓ホルモン ANP と BNP が高値を示した原因は、原発に僧帽弁閉鎖不全症が進行し、左心不全による肺高血圧など

が起こり、肺循環を経由して右室圧が上昇して三尖弁閉鎖不全症が併発し、両心房負荷及び心房、心室の心筋伸展によるものと思われた。

また感度と特異度については、ANP 値は感度が高く、心臓の容量負荷、心房の心筋を評価するスクリーニング検査および心房の心筋線維化あるいは心房の心筋障害を検出に優れていると思われた。BNP 値については感度が低めだが、特異度が 86%と高かった。つまり心室の心筋線維化あるいは心室筋障害などを鑑別することに有用と思われた。また ROC 曲線の下面積(AUC)については ANP が 0.691 で 0.7 に近く中程度の診断能を示したが、BNP は 0.667 でやや低めの値を示した。

重症度の評価について、削瘦のため、心臓全体の描出が困難な個体が多く、今回の心臓エコーは僧帽弁および三尖弁の逆流検出を主体に、LA/AO 比、E peak、A peak などヒト医療において重症度を評価する項目 [51, 56] は測定しなかった。一方、重度な僧帽弁閉鎖不全症の個体では ANP, BNP 値は共に高値を示した。病理組織学的検査の結果では、心室の重度な線維化が認められた。また、ANP, BNP 値は重症度が進むほど上昇することが明らかになった。弁膜症は慢性心疾患であるため、生存している個体が多く、解剖検査または病理組織学的検査を実行することが難しい。そのため、今後検査時は肺動脈楔入圧などの容量負荷評価を並行に実施する必要があると思われた。

今回は房室弁逆流群での BNP が検出限界以下の個体が多かったが、心疾患を持たないヒトでも BNP は極めて低値を示すと報告されている[49]。本研究では僧帽弁閉鎖不全症と三尖弁閉鎖不全症を対象に、心臓エコー図検査で逆流が認められた個体を抽出したため、まだ症状が初期で、心臓容量負荷、心室負荷、心筋伸展など心臓ホルモンの分泌量を促進する影響が弱かったと思われる。BNP はアミノ酸配列と組織内分布の両方で種差が大きいことから。測定値に影響を与えた可能性も考えられる。また、今回使用した E test TOSOH II BNP キットは抗 BNP マウスモノクローナル抗体を用いた IEMA 法であった。モノクローナル抗体は BNP の C 末端部位及び環状構造部位を認識するが、カニクイザルの血漿中 BNP を認識できなかった可能性も考えられる。今後の BNP 測定に関しては、N 末端を認識する抗体を用いて検討する必要があると思われる。

第5節 小括

本章では僧帽弁閉鎖不全症、三尖弁閉鎖不全症を呈したカニクイザルにおける心臓ホルモン値測定の臨床的意義について検討した。MR 群および MR・TR 群では心臓ホルモンは健康な個体より有意に高値を示した。心臓の線維化が進んだ重症の個体においては心臓ホルモン値が ANP 値と BNP 値両方とも高値を示したため、カニクイザルの心臓ホルモン値測定はヒトと同様に、心臓の容量負荷、心筋損傷などの評価、心疾患の診断に有用な指標と示唆された。

第4章

先天性心疾患における心臓ホルモン値の有用性の検討

第1節 はじめに

心疾患の病態解明、新規診断・治療法開発研究推進のためにはモデル動物を用いた外挿研究が不可欠である。様々な実験動物の中でも、最終的な外挿動物としてサル類は重要な位置をしめている。近年、心疾患を含めた様々な医科学研究分野でヒトに最も近縁なサル類が関心を集めていたが、心疾患の報告例は少ないため、病態解明が困難である。

近年、ブタを用いた循環器研究が知られているが、ブタより実験用サル類はヒトとの類似性が高いことから、心疾患のモデル動物として有用性が注目されている。日本では、カニクイザルは小型狭鼻猿類で飼育されやすい。霊長類医科学研究センターでは、カニクイザルを1,500頭以上飼育し[21]、個別飼育を行い、遺伝性疾患などの家系調査を行うことが可能である。そのため、カニクイザルは日本に最も多く医科学研究に使われる実験動物で、そのモデル動物としての有用性も注目されている。モデル動物がヒトと同様な病態を示すことにより、その病態解明とともにヒトの創薬開発や治療法及び術式の検討に大きく貢献すると思われる。

本章は病態および臨床所見のみならず、第2章および第3章で検討した心臓ホルモン ANP, BNP 値が先天性心疾患においてスクリーニングの有用性について検討を行った。

第2節 材料および方法

先天性心疾患個体の抽出

運動不耐性およびチアノーゼを示した2個体を塩酸ケタミン鎮静下(5-10mg/kg, I. M., ケタラール®; 第一三共プロファーマ, 東京)にて仰臥位に保定し、大腿静脈より採血した。

採取した血液の扱いは第2章および第3章と同様に、直ちにEDTA処理し、測定した、直ちに測定できない場合は血漿を冷凍保存し、測定時15-25°Cに戻し、速やかに測定を行った。使用したキットについて、ANPはE test TOSOH II ANPキット(TOSOH Corp., Tokyo, Japan)、BNPはE test TOSOH II BNPキット(TOSOH Corp., Tokyo, Japan)を使用した。分析は全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-360及びAIA-900(TOSOH Corp.)を用いて測定した。

症例は心臓ホルモン値ANP, BNPが非常に高値を示したため(Table 6)、胸部単純X線検査、心電図検査、心臓エコー図検査などの臨床検査を行った。予後不良判断し安楽死を実施し、解剖検査および病理組織学的検査を行った。

第3節 結果

症例1は右室二腔症症例と診断された。胸部単純X線検査では、右ラテラル像では心尖部が胸骨に接し、腹背像では心陰影の拡大、特に右心系の拡大所見が認められた(Fig.10)。心電図検査は心拍数が171回/min、QRS軸は84°で右軸変位は認められなかったため、心電図には異常がみられなかった(Fig.11)。心エコー図検査では左室大動脈弁レベルの短軸像で肺動脈下の右室流出路に異常筋束と思われる高エコー所見がみられた(Fig.12A)。カラードプラでは異常筋束による狭窄部から肺動脈弁へ向けての高速乱流(4.5m/s)が確認された(Fig.12B)。また右心室ならびに右心房の軽度拡張が認められた。解剖所見においては、肺動脈弁下の右室流出路に乳頭筋を巻き込んだ狭窄部が観察された(Fig.13)。心臓ホルモン値の測定に関しては、ANP値が165.00 pg/ml、BNP値が91.10 pg/mlであった(Table 6)。病理組織学検査はマッソントリクローム染色を行い、異常筋束において広範囲の線維化が認められた(Fig.14A)。コントロール(Fig.14B)と比べると右心室の肥厚が著しく認められた。異常筋束の切片においては広範囲の線維化所見(Fig.14C)、心室壁の組織では線維化および心筋の錯綜配列の所見が認められた(Fig.14D)。

症例2は心室中隔欠損によるアイゼンメンジャー症候群と診断した。胸部単純X線検査では、心陰影の拡大、右心系の拡大所見が認められた(Fig.15)。心電図検査においては心拍数125回/min、QRS軸は145°右軸偏位を示した、その他、QT延長、テント状T波、肺性P波、脚ブロックなどの心負荷の異常所見

が認められた(Fig. 16)。心エコー図検査においては、VSD 孔による右←左のシャントが観察された、乱流の最高速度は 1.7 m/s、圧較差は 11.6 mmHg(Fig. 17)。解剖検査では肺動脈の近くに VSD 孔が観察され、右心室の肥厚を認められた(Fig. 18)。心臓ホルモン値を測定した結果、ANP 値が 661.60 pg/ml, BNP 値が 689.30 pg/ml で非常に高い値を示した(Table 6)。病理組織学的検査ではマッソントリクローム染色を行った。組織切片では肺動脈の狭窄および VSD 孔周囲の線維化がみられた(Fig. 19)。

Table 6. 先天性心疾患と診断されたカニクイザルにおける心臓ホルモン値

| | ANP (pg/ml) | BNP (pg/ml) |
|---------|---------------|-------------|
| 右室二腔症 | 165.00 | 91.10 |
| 心室中膈欠損症 | 661.60 | 689.30 |
| 健康群 | 21.77 ± 14.25 | 2.27 ± 2.25 |

健康群の値は第2章を参照, * mean ± SD

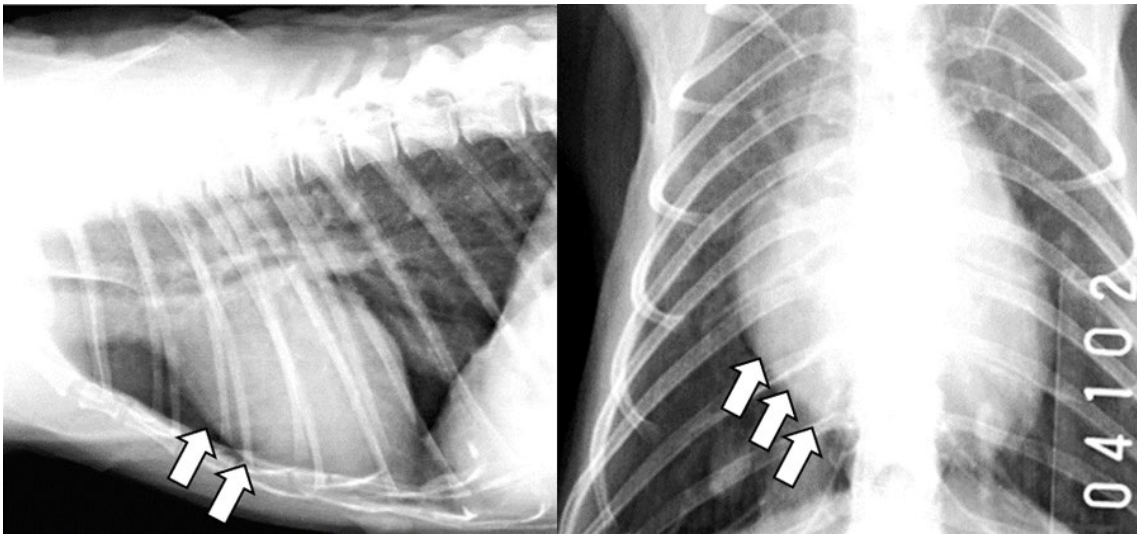


Fig.10 右室二腔症を呈したカニクイザルの単純X線画像所見

左：心尖部（右心室）が胸骨に接していた。

右：右心系、心陰影の拡大が認められた。

心胸郭比（CTR）については胸腔が全視野に収まってなかったが、58%と推定した。

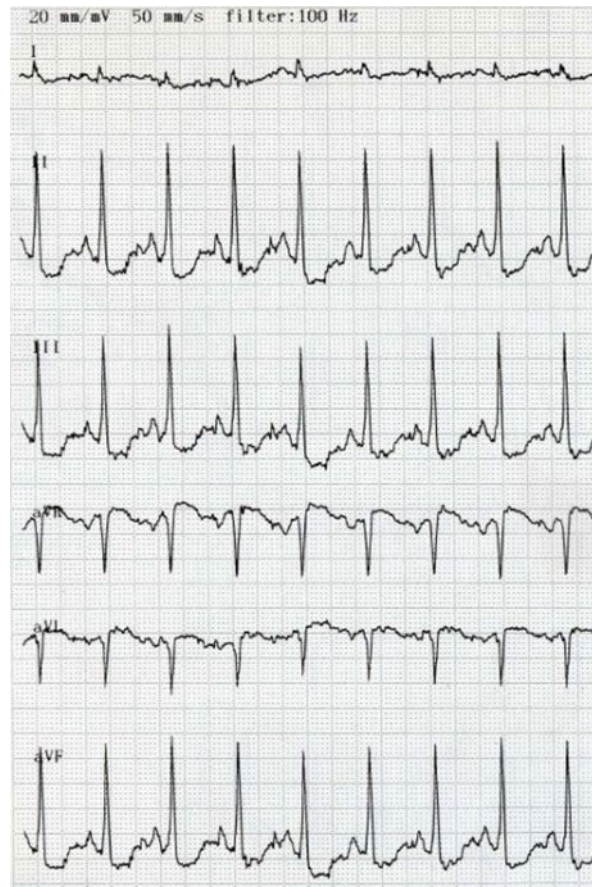
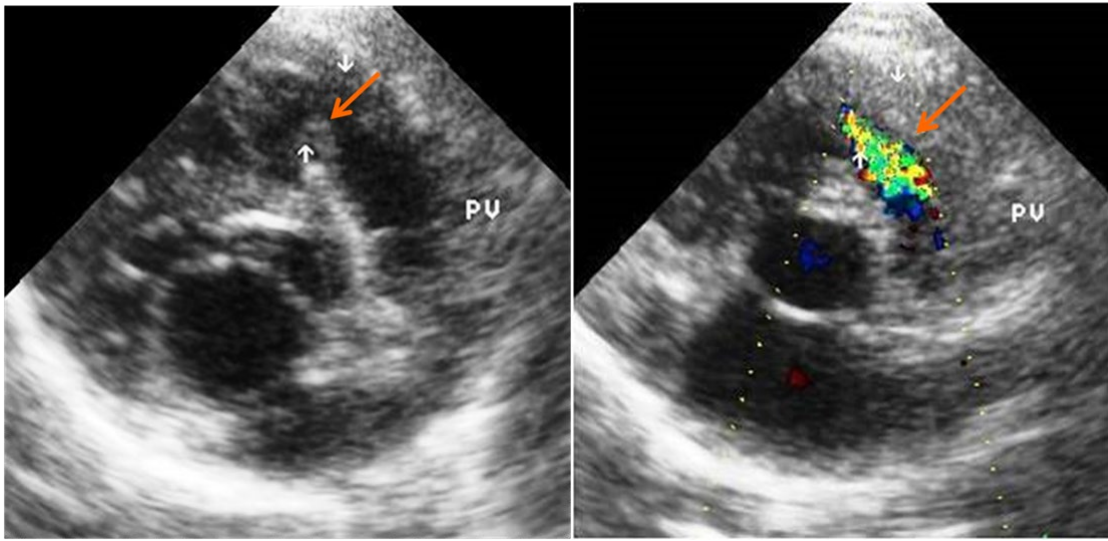


Fig.11 右室二腔症個体の心電図検査所見

心拍数 171 回/min、QRS 軸 84° ($<90^{\circ}$) であり、右軸変位は認められなかった

(20 mm/mV, 50 mm/s)。



A

B

Fig.12 右室二腔症個体を呈したカニクイザルの心エコー図所見

A:肺動脈下の右室流出路に異常筋束の高エコー所見(矢印)。

B:異常筋束(矢印)より肺動脈弁(PV)方向への高速乱流が確認された。

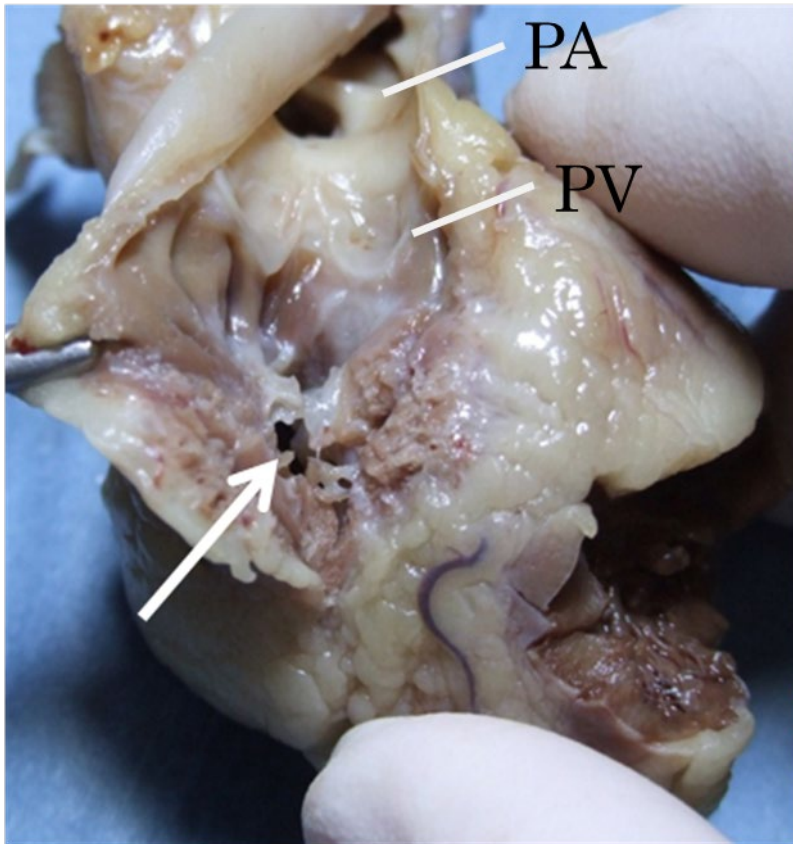


Fig. 13 右室二腔症を呈したカニクイザルの心臓解剖所見

肺動脈弁下の右室流出路に、乳頭筋を巻き込んだ狭窄部が認められる（矢印）。PA：肺動脈，PV：肺動脈弁

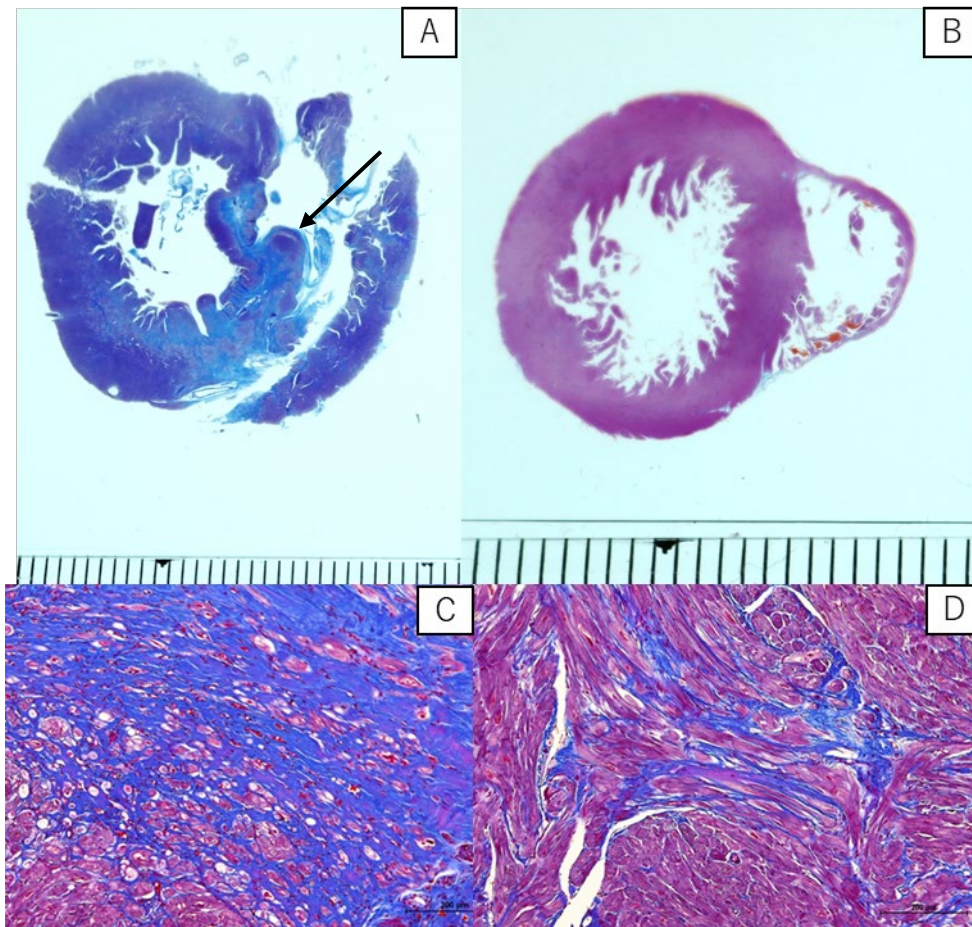


Fig.14 右室二腔症を呈したカニクイザルの病理組織所見

A:心臓の組織切片横断面：右室の肥大が観察された（矢印：異常筋束）。

B:健康カニクイザルの心臓の組織切片横断面

C:Aで見られた異常筋束部では線維化所見

D:右心室の心筋における錯綜配列所見

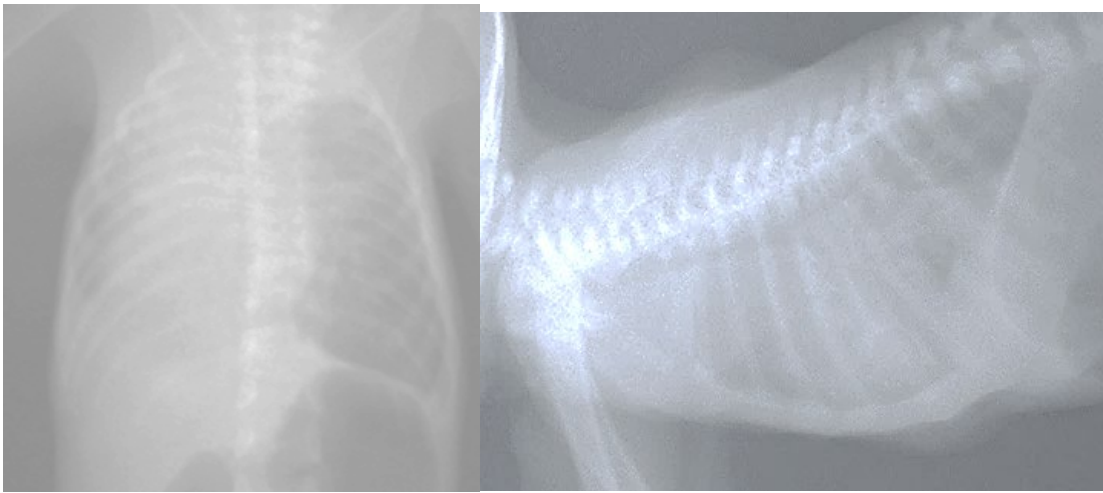


Fig. 15 心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群を呈したカニクイザルにおける単純X線画像所見

左：肺透過性低下、心陰影不明瞭、右心系の拡大。

右：肺透過性低下、心陰影不明瞭。

心胸郭比（CTR）は肺透過性の低下によって正確に判定するのが難しいが、推定値として64%であった。

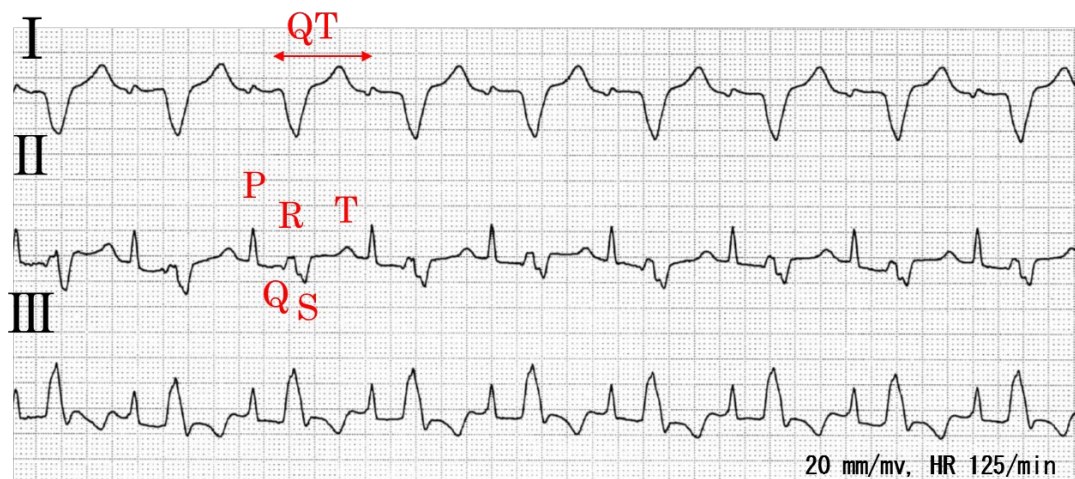


Fig. 16 心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群を呈したカニクイザルにおける心電図所見

心拍数 125 回/min

I 誘導から QT 延長、脚ブロック

II 誘導からテント状 T 波、肺性 P 波

I 誘導と II 誘導の QRS 波の平均振幅を Einthoven の正三角形に用いて右軸偏位 145° ($<90^{\circ}$) が認められた。

(20 mm/mV, 50 mm/s)

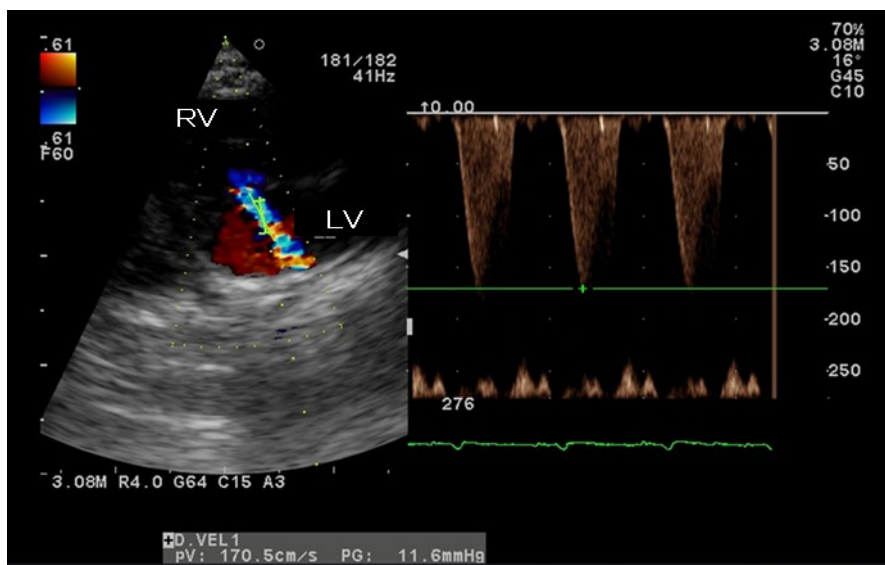


Fig. 17 心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群を呈したカニクイザルにおける心エコー図検査所見

VSD 孔による右-左のシャントが観察された。

乱流の最高速度(PV) : 1.7 m/s, 圧較差(PG)は 11.6 mmHg であった。

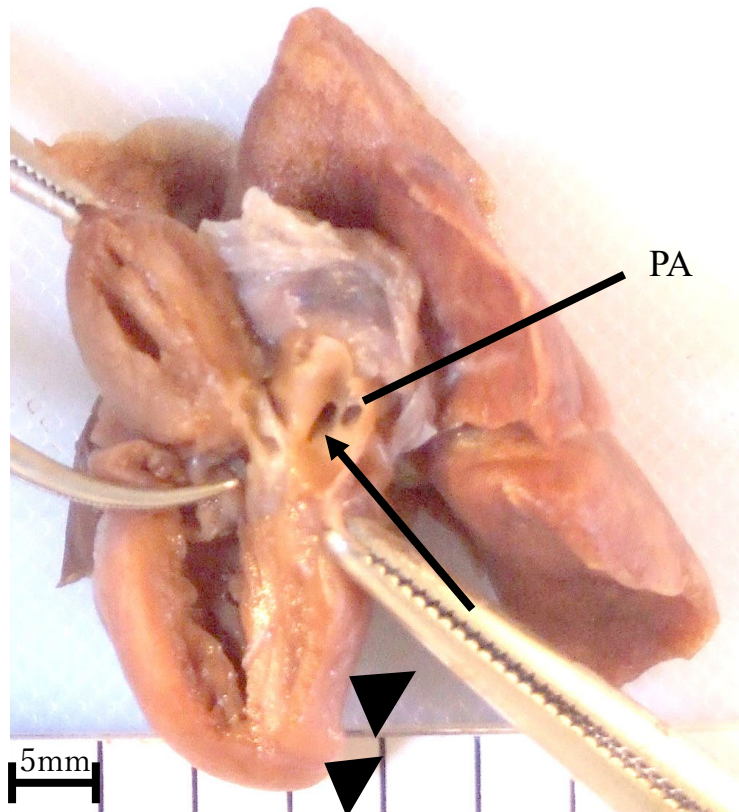


Fig. 18 心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群を呈したカニクイザルにおける病理所見

肺動脈 (PA) の近くに VSD 孔 (矢印) が観察され、右心室の肥厚 (矢頭) 所見。

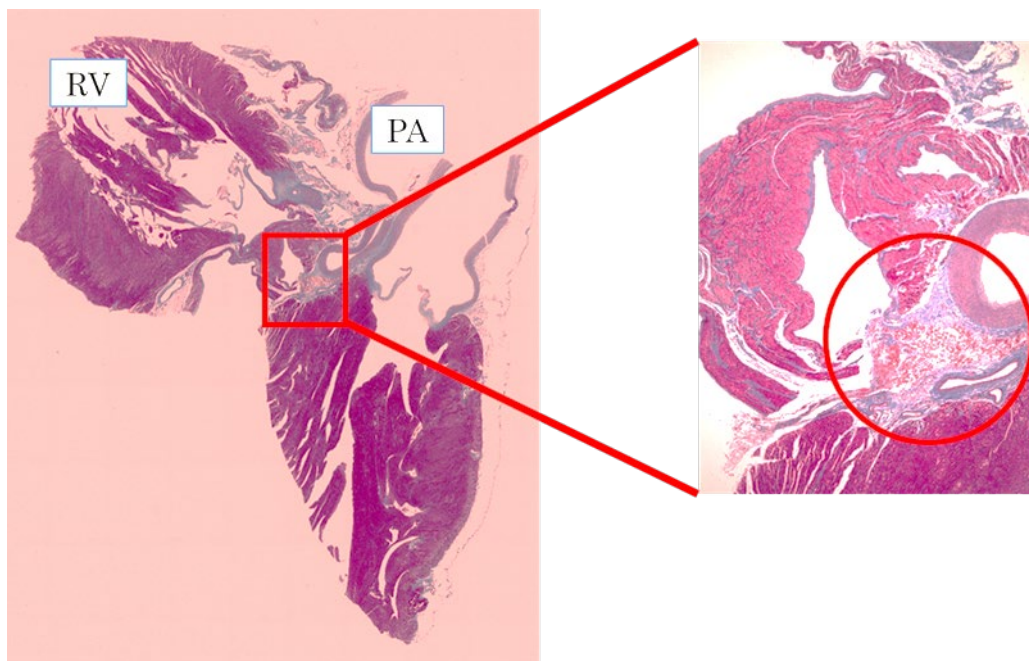


Fig. 19 心室中膈欠損症によるアイゼンメンジャー症候群を呈したカニクイザルにおける病理組織所見 (MT 染色)

左：肺動脈の狭窄、VSD 孔周囲の線維化

右：VSD 孔周囲の線維化

第4節 考察

本章で対象とした症例1は先天性心疾患の右室二腔症(Double-chambered right ventricle, DCRV)と診断し、症例2は心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群(Eisenmenger syndrome)と診断した。DCRVは文字通り右心室の右室流出路に形成された異常筋束によって右室腔が二分化される(Fig. 20)。異常筋束の発生部位によって High type と Low type の2種類に分類される[5, 18] (Fig. 21A, Fig. 21B)。右室二腔症の病態が進むと重度な右心系負荷をもたらす[36]。現在、右室二腔症はヒトでも発生が稀で、イヌ、ネコでの報告も少ない[5, 31, 32]。症例2で観察されたアイゼンメンジャー症候群は心室中隔欠損症(Ventricular septal defect, VSD)や動脈管開存症(Patent ductus arteriosus, PDA)などの先天性心疾患をきっかけに、右室内の圧力上昇によってバイパス路を介して左室へ静脈血が流れ込む病態を示す、今回の症例2は心室中隔欠損症が原因であった(Fig. 22)。

今回の2症例ともに単純X線検査では肺透過性低下、心陰影、右心系の拡大の所見が観察された。症例1の右室二腔症は肺動脈下に発生した異常筋束により、右心室が二分され、異常筋束の上に低圧腔になり、血液を送るため、異常筋束下の高圧腔の内圧が上昇し、右心系が拡大する。右心系の拡大により、心房の容量負荷、また心拡大による心筋伸展から本症例の ANP と BNP 値を高値と示したと思われる。症例2の心室中隔欠損によるアイゼンメンジャー症候群は心室中隔孔から左→右シャントを調整するため、肺の血流量が増加し、肺高血圧になり、その影響で肺の血流量が減少した現象に対抗し、右室内圧が上昇し、右→

左シャントが生じたと思われる。右室二腔症症例と同様に心房の容量負荷、また心拡大による心筋伸展からアイゼンメンジャー症候群個体の ANP と BNP 値が高値と示していたと思われる。今回正確に測ることができなかった心胸郭比 (CTR) に関しては、2 症例ともにヒトの標準値 (男性 : 50%, 女性 55%) を超えた。

心電図検査は侵襲が少なく、得られる情報が多いため、臨床検査としてよく用いられている。今回の 2 症例に関しては、右室二腔症の個体は単純 X 線検査で心拡大所見がみられたにも関わらず、心電図異常を示してなかった。右室二腔症の筋束の位置は時間をかけて移動する報告があり [6]、筋束の位置により右心室内の圧が変動する。右室二腔症症例は 21 歳齢で (Table 7)、慢性化の可能性があり、心臓の容量負荷あるいは心筋の伸展が緩やかに進行したと思われる。アイゼンメンジャー症候群の個体においては、右心系が肥大する右軸偏位所見から心筋伸展による BNP 値の増高、肺高血圧症で観察される肺性 P 波などの右房に圧や容量の負荷所見が観察されたことから、ANP 値が非常に高値を示したと思われる。また、本症例は 1 ヶ月齢と非常に若い個体であったため (Table 7)、病態の進行が早く心臓容量負荷、心筋障害が重度であったため、心臓ホルモン値が高値を示したと思われる。

心エコー図検査では、右室二腔症個体の左室大動脈弁レベル短軸像で肺動脈

下の右室流出路に異常筋束と思われる高エコー所見がみられた。これは、ヒト医療において観察された所見と一致した[18]。また、異常筋束より肺動脈弁方向への高速乱流が観察された。カニクイザルにおける右室二腔症の診断法はまだ確定されていないが、心エコー図では右室流出路内にある異物状な構造の検出に有効であることが示唆された。ヒト、イヌ、ネコでは確定診断に心カテーテル検査が用いられる[5, 8, 13, 35]。心カテーテル検査はまた心内圧検査と心血管造影検査の 2 種類がある[5, 13]。心内圧検査は右室流出路と右心室間の圧の差を測り、心血管造影は右室造影で漏斗部の下に右心室が二つの腔に分けられる陰影欠損像の描出を目的とする。今後はこれらの検査法がカニクイザルにも適用を可能か検討する必要がある。

アイゼンメンジャー症候群の心エコー図に関しては、今回の症例は VSD 孔による右-左のシャントが観察されたことによって確定診断に至った。心エコー図検査と心臓ホルモン値との関係については、著しく心房の拡張または心室壁の肥大が観察された場合に心臓容量負荷による ANP 値の上昇、心室筋伸展による BNP 値の上昇が観察されると思われる。

右室二腔症症例の病理解剖検査により、肺動脈弁下の右室流出路に乳頭筋を巻き込んだ狭窄部が観察されたため確定診断に至った。また、心臓の組織切片横断面に異常筋束が認められ、正常個体に比べて右心室組織の肥厚が明らかであった。異常筋束および肥厚した右心室領域では、広範囲の線維化、心筋の錯綜配列などによる心筋障害または心室負荷により心臓ホルモンの分泌量が上昇した

と考えられた。

アイゼンメンジャー症候群個体の解剖検査では、肺動脈の近くに VSD 孔が観察され、心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群と確定診断した。肉眼で確認した右心室の肥厚所見は心電図検査の右軸偏位と一致した。病理組織学的検査では、個体がまだ1ヶ月齢でもあり、線維化が進んでなかったが、肺動脈の狭窄による右室心筋の伸展および VSD 孔周囲の線維化がみられ、心室負荷により心臓ホルモンの分泌量が上昇したと考えられた。

本章では先天性心疾患である右室二腔症と心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群の症例を1例ずつ抽出したが、両症例ともヒトにおける病態と類似していた。ヒトの右室二腔症では、加齢とともに異常筋束の位置が移動し、重症化した報告がある[6, 8]。右室二腔症個体は21歳で高齢のため、ヒトと類似した病態を示したと思われた。しかし、ヒトや、イヌでは右室二腔症は心室中隔欠損症ならび肺動脈狭窄を併発することが報告されているが[14, 15]、今回の個体ではいずれの所見も観察されなかった。アイゼンメンジャー症候群の症例では、肺動脈高血圧からの肺血管抵抗の上昇、右室の圧負荷および右室肥大が観察された。これらの症状はヒトの心室中隔欠損症にもよくみられる[11, 14]。今後は引き続きカニクイザルにおける両心疾患の症例数を蓄積し、モデル動物としての有用性を検討したい。

Table 7. 供試動物の体重及び年齢

| | | Sex | Weight (kg) | Age |
|------|---------|--------|-------------|--------------|
| 症例 1 | 右室二腔症 | female | 4.3 | 21 years old |
| 症例 2 | 心室中膈欠損症 | male | 0.239 | 1 month |

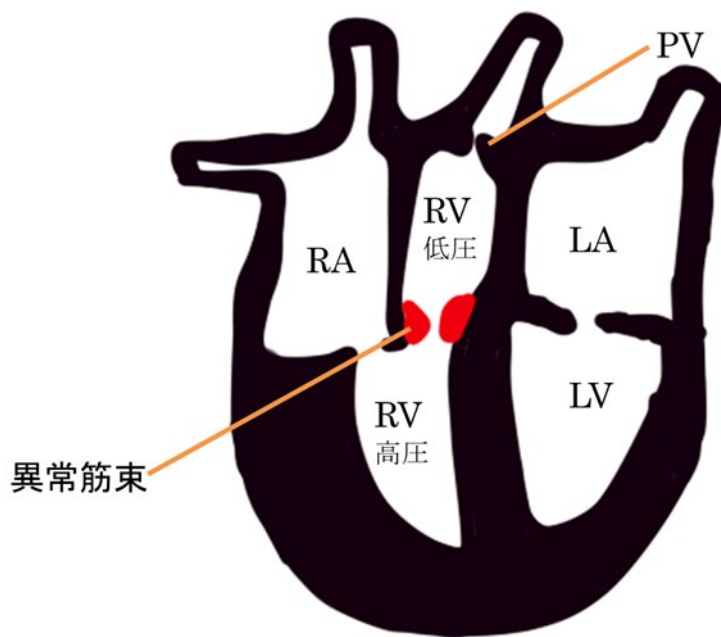


Fig. 20 右室二腔症 (DCRV)の模式図

右心室に異常筋束が発生し、右心室が高圧腔と低圧腔と二分される。

RA：右心房,RV：右心室,PV：肺動脈弁

LA：左心房, LV：左心室

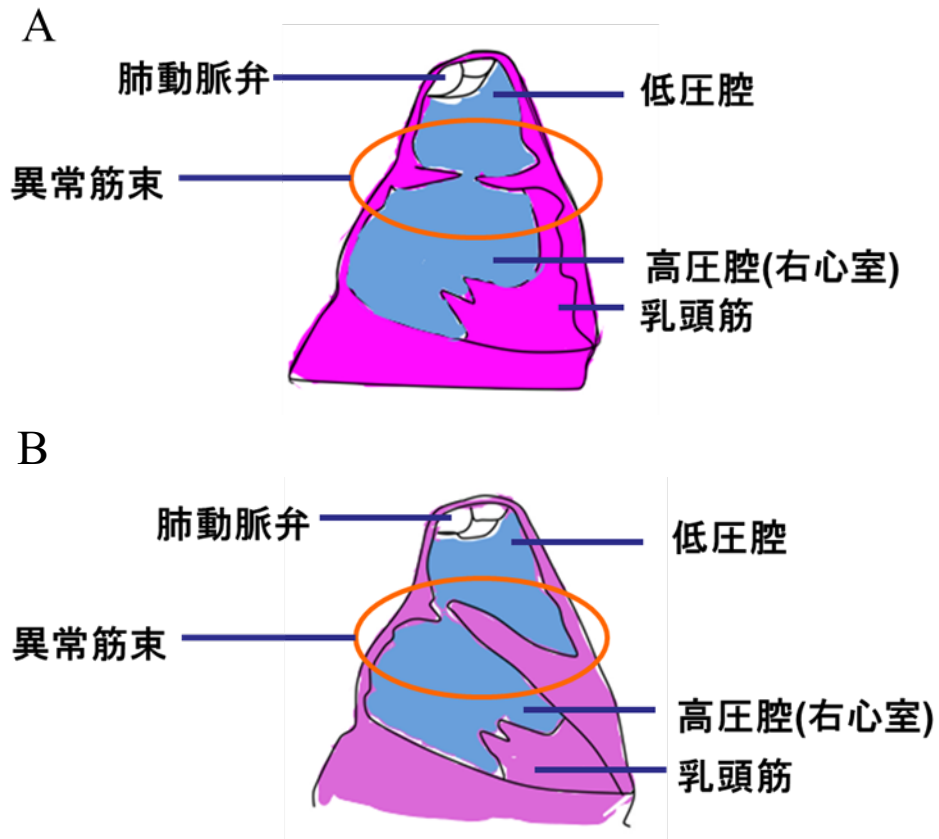


Fig. 21

A 右室二腔症 High type 異常筋束が肺動脈弁に近い。

B 右室二腔症 Low type 異常筋束が肺動脈弁から離れている。

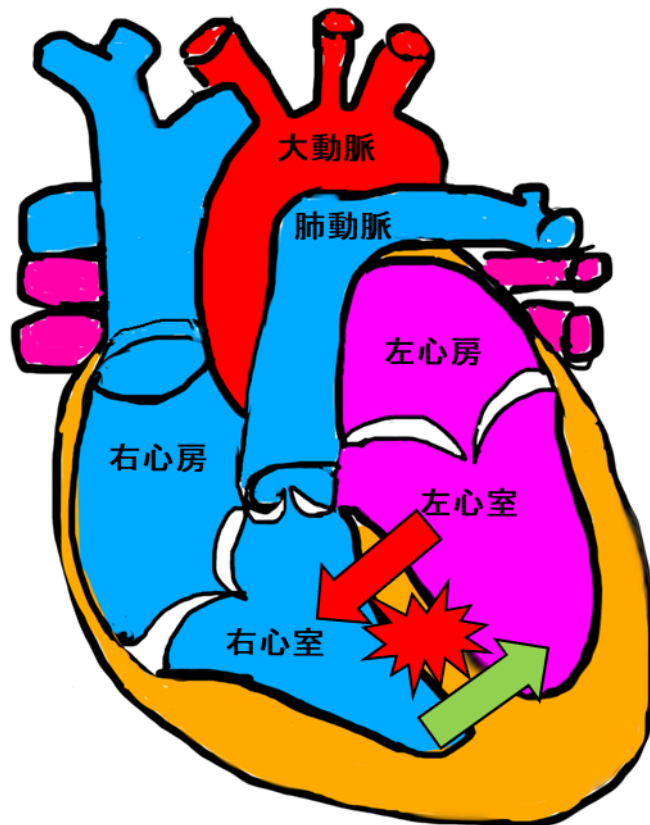


Fig. 22 心室中膈欠損症によるアイゼンメンジャー症候群の模式図

心室中膈に孔が開き、右心室が血液を拍出するために、右室内の圧力が上昇する。右室内圧が左室内圧より高くなり、右→左シャントが発生し（緑色矢印）、静脈血が左心室に流れ込む病態を示す。

第5節 小括

本章では先天性心疾患における病態生理学、臨床所見および心臓ホルモン値測定の有用性を検討した。ヒト医学においては、病態の解明および治療、術式開発にモデル動物を用いた実験が必要不可欠である。ヒトと生理学的機能、解剖学的構造を類似する実験用サル類は血液検査、心エコー図検査、心電図、病理解剖などの検査を通して、先天性心疾患の病態を解明する重要な外挿動物だと思われる。症例数は少ないが、サル類の右室二腔症およびアイゼンメンジャー症候群はヒトと類似することが明らかになった。右室二腔症の治療においては、現在ヒト、イヌ、ネコなどでは外科手術による異常筋束の切除が有効との報告もあり、この手技は実験用カニクイザルあるいは展示動物として飼育されているカニクイザルでの適用も検討し、アニマル・ウェルフェアの観点からもサル類の先天性心疾患に関する研究が重要だと思われた。

また、本章は第2章、第3章に続き、心疾患スクリーニング検査の指標として心臓ホルモン値の有用性について検討した。右室二腔症およびアイゼンメンジャー症候群では、心臓ホルモン値が高値を示した。

第 5 章

総括

人口の高齢化が進み、循環器疾患はがん、肺炎とならび日本の三大死因になり、循環器疾患は日本人の死因の15%を占めている。そのため、日本のみならず、世界各国の研究機関が循環器疾患の研究に力を注いでいる。

動物愛護の観点から、動物実験ではなく、細胞を用いた *in vivo* 研究が主流になりつつあるが、細胞のみで生物の複雑な生理動態を代替することはまだ解決すべき課題が多い。生物において動物種が変わるとその解剖生理学が完全に異なることも少なくないため、外挿実験に用いる実験動物の存在は必要不可欠である。近年動物実験では実験用サル類が注目されている。サル類はヒトと近縁で第二次世界大戦後、ヒトのワクチン開発や安全性試験に使われているが、獣医療においては、サル類についての検討はいまだに少ない、近年サル類はヒト医学領域では創薬や病態研究によく用いられたが、そのサル類の循環器研究に関するデータが少ない。サル類はヒトと近縁ではあるが、同様な病気でも必ずヒトと一致することは限らない。動物福祉からの観点でも、サル類における病態の検討また研究の蓄積が必要だと思われる。

本研究はヒト医療における健康診断のスクリーニング検査や心不全のステージおよび予後の判定に使われているマーカーである心臓ホルモン ANP, BNP が実験用サル類として飼育されているカニクイザルにおける有用性またその基準値について検討を行った。

1. カニクイザルの心臓ホルモンの基準値

ナトリウム利尿ペプチドは、心臓壁に異常な高圧による心筋伸展もしくは容積負荷が加わったときに分泌される心臓ホルモンである。代表として ANP と BNP がよく知られている。ANP は主に心房の、BNP は主に心室の心筋細胞から産生分泌される。ANP は心筋細胞内で顆粒として貯蔵されるが、BNP は心室に負荷が加わってから合成および分泌される。2つの心臓ホルモンは現在ヒト医療現場で、心負荷評価、また心損傷の予後評価に応用されている。

本章では繁殖コロニーとして飼育された健康なカニクイザルを用いて、カニクイザルにおける心臓ホルモン ANP、BNP の基準値、また、心臓ホルモン値と性別、年齢および体重の相関について検討した。

本研究で用いられたカニクイザル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 114 頭（メス 79 頭オス 35 頭）である。これらの健康なカニクイザルの心臓ホルモン値 ANP, BNP について検討を行った。

得られた健康なカニクイザルの心臓ホルモン値は、ANP: 20.71 ± 13.52 pg/ml で、BNP: 2.36 ± 2.23 pg/ml であった。

本章では、健康なカニクイザルの心臓ホルモン(ANP, BNP)基準値を確立した。確立された基準値は実験用サル類の基準になるだけでなく、動物園に飼育されるサル類における血液スクリーニングの参考、あるいは海外のサル類循環器研究においても貢献を寄与すると思われる。カニクイザルとヒトの異なる点を検討し、得られた結果は実験動物ならびにサル類の動物福祉向上に有用なデータとなると思われる。

2. 房室弁逆流が観察されたカニクイザルの心臓ホルモン値の有用性

本章ではヒト医療または獣医療現場に多くみられる房室弁逆流、僧帽弁閉鎖不全症および三尖弁閉鎖不全症を罹患したカニクイザル群を用いた。

本研究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飼育された心雑音が聴取され、あるいは僧帽弁、三尖弁に逆流が観察されたカニクイザル 57 頭を用いた。第 1 章と同様に心臓ホルモン値 ANP, BNP の算出と性別、年齢、体重の相関について検討を行った。また第 1 章で得られた健康群の心臓ホルモン値を用いて、房室弁逆流群の心臓ホルモン値との比較を行った。

弁膜症群の心臓ホルモン値は ANP:45.03 ± 59.40 pg/ml で BNP:15.06 ± 35.99 pg/ml であった。僧帽弁閉鎖不全症群と三尖弁閉鎖不全群、僧帽弁閉鎖不全群と三尖弁閉鎖不全併発群の 3 群に分けて、健康群の心臓ホルモン値と比較すると僧帽弁閉鎖不全症群および僧帽弁閉鎖不全群と三尖弁閉鎖不全併発群の心臓ホルモン ANP 値, BNP 値ともに健康群より有意に高値を示した。また重症度が進行し、予後不良と判断した個体の組織切片を用いて、解剖検査、病理組織学的検査を行った結果、心臓の線維化および心室の肥大の進行により心臓ホルモン ANP 値, BNP 値が高値を示した。以上の結果によって心臓ホルモン ANP は心房容量負荷、心房の心筋伸展あるいは障害を評価するマーカー、BNP は心室負荷、心室の心筋伸展あるいは障害を評価するマーカーとして有用性が明らかになった。また、BNP の感度が低い、その理由は、まだ重症度が進行してなかった、BNP のアミノ酸配列における種差や、測定キットに使用された抗体の

感度などを挙げたが、心臓の線維化が進んだ重症の個体においては心臓ホルモン値が ANP 値と BNP 値両方とも高値を示したため、カニクイザルの心臓ホルモン値測定はヒトと同様に、心房の容量負荷、心房あるいは心室の心筋障害の診断および健康診断のスクリーニングに有用な指標と示唆した。

3. 先天性心疾患における心臓ホルモン値の有用性の検討

心疾患の病態解明、新規診断・治療法開発研究推進のモデル動物として、様々な実験動物を用いるが、最終的に外挿動物としてサル類は重要な位置を占めている。心疾患を含めた様々な医科学研究分野でヒトに最も近縁なサル類が関心を集めていたが、まだ心疾患に関する報告例は少ないため、病態解明が困難である。先天性心疾患の発生は稀で、ヒトと同様な病態を示した場合、創薬開発や治療法及び術式の検討に大きく貢献するため注目されている。

本章では、運動不耐性、チアノーゼを示した個体について、心臓ホルモン値のスクリーニングを行った。臨床検査も行い、胸部単純 X 線、心電図、心エコー図検査を実施した。その結果、両個体とも心臓ホルモン ANP 値と BNP 値が非常に高値を示した。臨床検査では、単純 X 線検査において肺透過性の低下、心陰影、右心系拡大の拡大が観察され、心電図では、心室中隔欠損によるアイゼンメンジャー症候群個体が QT 延長、テント状 T 波、右軸偏位などの心負荷所見を示し、心エコー図検査では両疾患が特徴した所見がみられた。その結果で、症例 1 は右室二腔症と症例 2 は心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群と

診断した。右室二腔症においては右室流出路における異常な筋束が認められた。心室中隔欠損症によるアイゼンメンジャー症候群のエコーでは、VSD 孔による右-左のシャントが観察された。解剖および病理組織学的所見では心室の肥大や線維化などが観察され、臨床検査と心臓ホルモン値検査の高値と一致した組織像を得られた。本研究で観察された心臓組織の線維化および心室の肥大所見は右室負荷によるものと思われた。従って心臓ホルモン値の評価はカニクイザル心臓容量負荷または心臓線維化または心筋障害のスクリーニング検査や診断に有用であると思われた。症例数が少ないが両症例ともヒトと類似している病態を示した。

以上のように、心臓ホルモン値を用いたスクリーニング検査は血液のみで心房の容量負荷および心室負荷と心筋伸展を評価できることから、その応用が期待される。本研究成果を応用することにより、実験動物としてのカニクイザルの循環器疾患研究だけではなく展示用動物サル類の循環器疾患のスクリーニングにも適用できることで、サル類の動物福祉向上に大きく貢献することを期待する。

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浅野 和之教授、佐藤 雪太教授に深謝いたします。

また、本研究にご助言を頂いた同大学院獣医病態生理学研究室の中山 駿矢 研究員、本研究を実施するに、ご助言を賜りまし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、一般社団法人 予防衛生協会の棟居 佳子研究員、大野 智恵子研究員に深謝いたします。

参考文献

1. Abdelalim, E.M., Takada, T., Torii, R. and Tooyama, I. 2006. Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical localization in the hypothalamus of monkey. *Peptides*. **27**: 1886–1893.
2. 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.* **25**: 151–158.
3. 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.
4. Aizawa, K., Ageyama, N., Yokoyama, C. and Hisatsune, T. 2009. Age-dependent alteration in hippocampal neurogenesis correlates with learning performance of macaque monkeys. *Exp. Anim.* **58**: 403-407.
5. Alva, C., Ho, Y.S, Lincoln, C.R., Rigby, M.L., Wright, A and Anderson, R.H. 1999. The Nature of the Obstructive Muscular Bundles In Double-Chambered Right Ventricle. *J.Thorac Cardiovasc.Surg.* **117**: 1180-1189.
6. Amano, M., Izumi, C., Hayama, Y., Onishi, N., Tamaki, Y., Enomoto, S., Miyake, M., Tamura, T., Kondo, H., Kaitani, K., Yamanaka, K and Nakagawa Y. 2015. Surgical Outcomes and Postoperative Prognosis Beyond 10 Years for Double-Chambered Right Ventricle. *Am.J.Cardiol.* **116**(9):1431-1435
7. Asano, K., Masuda, K., Okumura, M., Kadosawa, T. and Fujinaga, T. 1991. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J. Vet. Med. Sci.* **61**: 523–529.
8. Barik, R. 2017. Role of Echocardiography in Treating a Case of Double Chamber Right Ventricle with Delayed Presentation. *J Echocardiogr.* **27**(1):10-13.
9. Blume, S. and Geesink, I. 2000. A brief history of polio vaccines. *Science*. **288**: 1593-1594.

10. BOUMANS P. W. J. H. 1978. *Spectrochim. Acta Part B.* 33:625.
11. Bu, H., Gong, X. and Zhao, T.2020. Image diagnosis: Eisenmenger's syndrome in patients with simple congenital heart disease. *BMC Cardiovasc Disord.***20**:194
12. Clerico, A., DelRy, S., Maffei, S., Prontera, C., Emdin, M., and Giannessi, D. 2002. The circulating levels of cardiac natriuretic hormones in healthy adults: effect of age and sex. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**: 371–377.
13. Cil, E.,Saraçlar, M.,Ozkutlu, S.,Ozme, S.,Bilgiç, A., Ozer S .,Celiker, A ., Tokel, K and Demircin, M. 1995. Double-chambered right ventricle: experience with 52 cases. *Int. J. Cardiol.* **50**(1):19-29.
14. Engelfriet, M. P., Duffels, G. J. M., Möller, T., Boersma, E., Tijssen, G. P. J., Thaulow. E., Gatzoulis, A.M., and Mulder, J. M. B. 2007. Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart.* **93**(6):682-687
15. Fukushima, R., Tanaka, R., Suzuki, S., Hamabe, R., Machida, N., Saida,Y., Takashima, K., Matsumoto, H., Koyama, H., Hirose, H . and Yamane, Y. 2011. Epidemiological and Morphological Studies of Double-chambered Right Ventricle in Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **73**:1287-1293.
16. Gaggin, H.K., and Januzzi, J.L. Jr. 2013. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1832**: 2442–2450.
17. Garg, L., Garg, J., Krishnamoorthy, P., Ahnert, A., Shah, N., Dusaj, R. S. and Bozorgnia, B. 2017. Influence of Pregnancy in Patients With Congenital Long QT Syndrome. *Cardiol. Rev.* **25**: 197–201.
18. Galiuto, L., O’Leary, PW. and Seward JB. 1996. Double-chambered right ventricle: Echocardiographic features. *J Am Soc Echocardiogr.* **9**:300–5.
- Gazoti, D.C.R., Mesiano M. L.B. and Rodrigues, de S. R. 2001. Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech. Ageing HV. Dev.* **122**: 1049–1058.

19. Goto, Y., Hiramatsu, Y., Ageyama, N., Sato, S., Mathis, B.J., Kitazawa, S., Matsubara, M., Sakamoto, H. and Sato, Y. 2019. Rolipram plus Sivelestat inhibits bone marrow-derived leukocytic lung recruitment after cardiopulmonary bypass in a primate model. *J. Artif. Organs.* **22**: 44–52.
20. Grewal, J., McKelvie, R.S., Persson H., Tait, P., Carlsson , J., Swedberg , K., Ostergren, J. and Lonn,E. 2008. Usefulness of N-terminal pro-brain natriuretic peptide to predict cardiovascular outcomes in patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction. *Am. J. Cardiol.* **102**: 733–737.
21. Honjo, S. 1985. The Japanese Tsukuba Primate Center for Medical Science (TPC): an outline. *J. Med. Primatol.* **14**: 75–89.
22. Honjo S. 1986. Guiding Principles for animal experiments using nonhuman primates. *Primate Rep.* **2**: 111–113.
23. Horwich, T.B., Hamilton, M.A.and Fonarow, G.C. 2006. B-type natriuretic peptide levels in obese patients with advanced heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**: 85–90.
24. Institute of Laboratory Animal Research. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *National Academies Press*, Washington, D.C.
25. 石井潤一 2009. 虚血性心疾患の心筋ストレスマーカー(BNP、ANP、NT-proBNP). 生物試料分析 **32**(2):135-144
26. Izumi, C., Eishi, K., Ashihara, K., Arita, T., Otsuji, ., Kunihara, T., Komiya, T., Shibata,T., Seo, Y., Daimon, M., Takanashi,S., Tanaka,H., Nakatani, S., Ninami, H., Nishi, H., Hayashida,K., Yaku, H., Yamaguchi, J., Yamamoto, K., Watanabe, H., Abe, Y ., Amaki, M., Amano, M., Obase, K., Tabata, M., Miura, T., Miyake,M., Murata, M., Watanabe, N., Akasaka, T., Okita, Y., Kimura, T., Sawa, Y. and Yoshida, K. 2020. JCS/JATS/JSVS/JSCS 2020 Guideline on the Management of Valvular Heart Disease. *Circ. J.* **84**: 2037-2119.
27. Kangawa, K., Fukuda, A., Kubota, I., Hayashi, Y., Minamitake, Y. and Matsuo, H.1984. Human atrial natriuretic polypeptides (hANP): purification, structure synthesis and biological activity. *J*

Hypertens Suppl. **2(3)**: S321-323.

28. Kangawa, K and Matsuo, H. 1984. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun.* **118**: 131-139.
29. 川喜田愛郎, 近代医学の史的基盤, 1977, 岩波書店, 東京.
30. Koegelenberg, A.S., Smith, W., Schutte, R. and Schutte, A.E. 2016. IGF-1 and NT-proBNP in a black and white population: The SABPA study. *Eur. J. Clin. Invest.*; **46**: 795–803.
31. Koffas, H., Fuentes, V. L., Bosswood, A., Connolly, D. J., Brockman, D. J., Bonagura, J. D., Meurs, K. M., Koplitz, S. and Baumwart, R. 2007. Double Chambered Right Ventricle in 9 cats. *Vet. Med.* **21**:76-80.
32. Koie, H., Kurotobi, E.N. and Sakai, T. 2000. Double-Chambered Right Ventricle in a Dog. *J. Vet. Med. Sci.* **62**: 651-653.
33. Li, X.F., Pan, D., Zhang, W, L., Zhou, J. and Liang, J.J. 2016. Association of NT-proBNP and interleukin-17 levels with heart failure in elderly patients. *Genet. Mol. Res.* **15**: 1–7.
34. Loke, I., Squire, I.B., Davies, J.E. and Ng, L.L. 2003. Reference ranges for natriuretic peptides for diagnostic use are dependent on age, gender and heart rate. *Eur. J. Heart Fail.* **5**: 599–606.
35. López-Alvarez J., Dukes-McEwan J., Martin MW., Killick, D., Fonfara, S and Fraser McConnell J. 2011. Balloon dilation of an imperforate cortriatriatum dexter in a Golden Retriever with concurrent double-chambered right ventricle and subsequent evaluation by cardiac magnetic resonance imaging. *J Vet Cardiol.* **13(3)**:211-218.
36. Loukas, M., Housman, B., Blaak, C., Kralovic, S., Tubbs, RS. and Anderson RH. 2013. Double-chambered right ventricle: a review. *Cardiovasc Pathol.* **22(6)**:417-423.
37. Matsuo, A., Nagai-Okatani, C., Nishigori, M., Kangawa, K. and Minamino, N. 2019. Natriuretic peptides in human heart: Novel insight into their molecular forms, functions, and diagnostic use. *Peptides.* **111**: 3–17.
38. Mehra, M.R., Uber, P.A., Park, M.H., Scott, R.L., Ventula, H.O., Harris, B.C. and Frohlich, E.D. 2004. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J. Am. Coll.*

- Cardiol.* **43**: 1590–1595.
39. Mukoyama, M., Nakao, K., Saito, Y., Ogawa, Y., Hosoda, K., Suga, S., Shirakami, G., Jougasaki, M., Obata, K., Yasue, H., Kambayashi, Y., Inouye, K. and Imura, H. 1991. Brain natriuretic peptide (BNP) as a novel cardiac hormone in humans: Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, ANP and BNP. *J. Clin. Invest.* **87**: 1402–1412.
 40. 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.* **18**: 1165–1173.
 41. Nakayama, S., Koie, H., Kato-Tateishi, M., Pai, C., Ito-Fujishiro, Y., Kanayama, K., Sankai, T., Yasutomi, Y. and Ageyama, N. 2020. Establishment of a new formula for QT interval correction using a large colony of cynomolgus monkeys. *Exp. Anim.* **69**: 18–25.
 42. Nakayama T. 2005. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. *Endocr J.* **52**(1):11-21.
 43. Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K. and Dickey, D. M. 2009. Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications. *Handb. Exp. Pharmacol.* **191**: 341–366.
 44. Redfield, M.M., Rodeheffer, R.J., Jacobsen, S.J., Mahoney, D.W., Bailey, K.R. and Burnett, J.C.Jr. 2002. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**: 976–982.
 45. 佐藤幸人, 藤原久義, 鷹津良樹 2008. 循環器疾患における血中 BNP, NT-proBNP 測定の意義. *J. Cardiol Jpn.* **2**(3):163-177.
 46. Sharma, V., Stewart, R.A., Lee, M., Gabriel, R., Van Pelt N., Newby, D, E. and Kerr, A.J. 2016. Plasma brain natriuretic peptide concentrations in patients with valvular heart disease. *Open Heart.* **4**: 1–9.
 47. Sitar Taut, A.V., Pop, D. and Zdrenghea, D.T. 2015. NT-proBNP values in elderly heart failure

- patients with atrial fibrillation and diabetes. *J. Diabetes Complications*. **29**: 1119–1123.
48. Stone, G. W., Vahanian, A. S., Adams, D. H., Abraham, W. T., Borer, J. S., Bax, J. J., Schofer, J., Cutlip, D. E., Krucoff, M. W., Blackstone, E. H., Généreux, P., Mack M. J., Siegel, R. J., Grayburn, P. A., Enriquez-Sarano, Maurice., Lancellotti, P., Filippatos, G., and Kappetein, A. P. 2015. Clinical Trial Design Principles and Endpoint Definitions for Transcatheter Mitral Valve Repair and Replacement: Part 1: Clinical Trial Design Principles. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**: 278-307.
 49. Sugawa, S., Masuda, I., Kato, K. and Yoshimura, M. 2018. Increased Levels of Cardiac Troponin I in Subjects with Extremely Low B-type Natriuretic Peptide Levels. *Sci. Rep.* **23**: 5120–5128.
 50. Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H., Katsuki, M., Nakao, K. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 4239–4244.
 51. 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.
 52. Wang, T.J., Larson, M.G., Levy, D., Benjamin, E.J., Leip, E.P., Wilson P.W. and Vasan, R.S. 2004. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation.* **109**: 594–600.
 53. 米田孝司. 2013. 心不全のバイオマーカー-BNP と NTP-proBNP-. *Sysmex j. web.* **14**(2): 1–13.
 54. Yoshida, T. and Fujimoto, K. eds. 2006. The TPRC handbook on the care and management of the laboratory cynomolgus. Springer Japan, Tokyo (in Japanese).
 55. Yoshimura, M., Yasue, H. and Ogawa, H. 2001. Pathophysiological significance and clinical application of ANP and BNP in patients with heart failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 730–735.
 56. Zoghbi, W. A., Adams, D., Bonow, R. O., Enriquez-Sarano, M., Foster, E., Grayburn, P. A., Hahn, R. T., Han, Y., Hung, J., Lang, R. M., Little, S. H., Shah, D. J., Shernan, S., Thavendiranathan, P., Thomas, J.D. and Weissman, N. J. 2017. Recommendations for Noninvasive Evaluation of Native

Valvular Regurgitation: A Report from the American Society of Echocardiography Developed in Collaboration with the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance. *J. Am. Soc. Echocardiogr* . **30**: 303-371.