

犬の循環器疾患に対する外科的介入による
レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性変化に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

鄭傑仁

2022年

略語

RAAS; Renin-angiotensin-aldosterone system

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系

MMVD; Myxomatous mitral valve disease 僧帽弁粘液腫様変性

PDA; Patent ductus arteriosus 動脈管開存症

PRA; Plasma renin activity 血漿レニン活性

ARC; Active renin concentration 活性レニン濃度

AT2; Angiotensin II アンジオテンシン II

PAC; Plasma aldosterone concentration 血漿アルドステロン濃度

ACEi; Angiotensin converting enzyme inhibitor アンジオテンシン変換酵素阻
害剤

LVIDd; Left ventricular internal diameter in end diastole 左心室拡張末期径

LVIDs; Left ventricular internal diameter in end systole 左心室収縮末期径

FS; Fractional shortening 左室内径短縮率

LVIDDN; Left ventricular end-diastolic internal diameter normalized to body
weight 体重標準化左室拡張末期径

LA/Ao; Left atrial-to-aortic root ratio 左心房径大動脈径比

E vel; Early diastolic mitral inflow velocity 拡張早期左室流入波流速

A vel; Late diastolic mitral inflow velocity 擴張後期左室流入波流速

Sep s'; Systolic wave signal at mitral annulus at the septal wall as measured by Tissue Doppler imaging 僧帽筋裝置中隔側收縮期速度

Sep e'; Early diastolic wave signal at mitral annulus at the septal wall as measured by Tissue Doppler imaging 僧帽筋裝置中隔側擴張早期速度

Sep a'; Late diastolic wave signal at mitral annulus at the septal wall as measured by Tissue Doppler imaging 僧帽筋裝置中隔側擴張後期速度

Fw s'; Systolic wave signal at mitral annulus at the left ventricular lateral wall as measured by Tissue Doppler imaging 僧帽筋裝置自由壁側收縮期速度

Fw e'; Early diastolic wave signal at mitral annulus at the left ventricular lateral wall as measured by Tissue Doppler imaging 僧帽筋裝置自由壁側擴張早期速度

Fw a'; Late diastolic wave signal at mitral annulus at the left ventricular lateral wall as measured by Tissue Doppler imaging 僧帽筋裝置自由壁側擴張後期速度

目次

	頁
序文	1
第1章 健常犬におけるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の 加齢による影響の検討	4
1. 緒言	5
2. 材料と方法	6
3. 結果	9
4. 考察	10
5. 小括	13
第2章 犬における動脈管開存症に対する閉鎖術が レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に与える影響の検討	18
1. 緒言	19
2. 材料と方法	21
3. 結果	23
4. 考察	24

5. 小括	27
第3章 犬における僧帽弁粘液腫様変性に対する僧帽弁形成術が レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に与える影響の検討	31
1. 緒言	32
2. 材料と方法	34
3. 結果	37
4. 考察	39
5. 小括	43
総括	49
謝辞	51
引用文献	53

序文

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) は循環血液量および血圧調節において重要な役割を果たす (Nakagawa et al., 2020)。RAAS は圧受容器反射を代表とする自律神経系に対し、より中長期的な循環代償機転であり、循環動態に影響する循環器疾患では、ステージ進行によって肺水腫や高血圧等の病態生理に深く関与する場合がある (Schrier & Abraham, 1999)。特にこの系統の慢性的活性化により過剰に生成されたアンジオテンシン II (Angiotensin II) とアルドステロン (Aldosterone) は、心筋、血管、糸球体に対し様々な機序で毒性を発揮し、これらの組織において最終的に病的リモデリング (線維化) と機能不全を引き起こすことが知られている (Ames et al., 2019)。

近年、アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (Angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEi) やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (Angiotensin receptor blocker, ARB)、Spironolactone をはじめとするミネラルコルチコイド受容体拮抗薬 (MRA) 等、RAAS の各構成要素を治療標的とする阻害薬が多数開発され、ヒト医療のみならず獣医療でも使用実績は積んでいるものの、RAAS が病態生理に関与する僧帽弁粘液腫様変性をはじめとした犬循環器疾患の罹患率が、国内外問わず依然として高い (Egenvall et al., 2006; Inoue & Sugiura, 2022)。

これまで犬循環器疾患の責任病変を有効に根治する外科治療が盛んに行われてきたが、治療前後での改善評価は主に心エコー指標や臨床症状にとどまっており、RAAS の観点からの知見は少ない。

そこで本研究では、犬において先天性心疾患として最も発生率の高い動脈管開存症（PDA）および、後天性心疾患として最も発生率の高い僧帽弁粘液腫様変性（MMVD）に対し外科介入前後の RAAS プロフィールを調べ、その変動を評価した。また、両対象疾患は犬が若齢と高齢それぞれの時期に頻発すると診断される時期に偏りがあることと、犬では RAAS 系が加齢に伴う変化も不明であるため、まず第 1 章では健常犬における RAAS 活性の加齢による影響を検討した。次に第 2 章では PDA に対する閉鎖術、第 3 章では MMVD に対する僧帽弁形成術、それぞれが RAAS に与える影響について検討を行った。

第1章

健全犬におけるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の

加齢による影響の検討

1. 緒言

ヒトでは RAAS 活性は加齢によって減少することが知られている (Belmin et al., 1994; Kerstens et al., 2011)。正常血圧を持つ健常者を対象に行われた先行研究によると 20 歳未満の若年者より 80 歳代の高齢者は、血漿レニン活性が 54%、アルドステロン濃度が 64%と低下していた (Tsunoda et al., 1986)。特に仰臥時より正座時、ナトリウム制限時、循環血液量減少時といった刺激下で、高齢者はアルドステロン分泌能が鈍化することによって、その差がより顕著であった (Weidmann et al., 1975)。一方、アンジオテンシン II の血漿濃度は高齢者と若年者の間で類似、もしくは高齢者がわずかに減少していた (Duggan et al., 1992)。

獣医療でみられる循環器疾患に対する外科介入前後の RAAS プロフィール変動を研究するにあたり、獣医学領域で犬の RAAS でもヒト同様に生理的な加齢変化がみられるかをまず検証すべく、本章では健常な若齢犬と成犬を対象に RAAS 活性を心臓超音波指標とともに調べた。

2. 材料と方法

1) 動物

2021年12月から2022年3月までの期間に、犬猫こども病院および東京農工大学動物医療センターに健康診断で来院し、身体検査、血圧測定、血液検査、心臓超音波検査にて異常所見なしを健常とした若齢犬（24ヵ月未満）12頭、成犬（24ヵ月以上）23頭を用いた。若齢群の犬種はプードル（n=2）、ポメラニアン（n=2）、柴犬（n=2）、マルチーズ（n=1）、ボルゾイ（n=1）、ハスキー（n=1）、グレート・ピレニーズ（n=1）、ラブラドル（n=1）、シーズー（n=1）であり、成犬群の犬種はトイ・プードル（n=4）、チワワ（n=3）、柴犬（n=3）、ポメラニアン（n=2）、雑種（n=2）、グレート・デーン（n=1）、ヨークシャー・テリア（n=1）、イングリッシュ・コッカー・スパニエル（n=1）、アメリカン・コッカー・スパニエル（n=1）、シーズー（n=1）、フラットコートッド・レトリバー（n=1）、ダックスフンド（n=1）、パピヨン（n=1）であった。

2) 心臓超音波検査

心臓超音波検査は超音波診断装置 Aplio™ 300 (Canon Medical Systems Co., Ltd., Tokyo, Japan) に接続するセクタ型プローブを用い、5 MHz の設定下にて

実施した。右側傍胸骨アプローチで短軸断面を描出し、乳頭筋レベルにて左心室拡張末期径 (LVIDd)、左心室収縮末期径 (LVIDs)、左室内径短縮率 (FS)、体重標準化左室拡張末期径 (LVIDDN)を、心基部レベルにて左心房径大動脈径比 (LA/Ao) と右室出路血流速度 (RVOT) を計測した。左傍胸骨アプローチで心尖部四腔断面を描出し、拡張早期左室流入波流速 (E vel)、拡張後期左室流入波流速 (A vel)、僧帽筋装置の中隔側における収縮期 (Sep s')、拡張早期 (Sep e')、拡張後期 (Sep a') 速度、僧帽筋装置の自由壁側における収縮期 (Fw s')、拡張早期 (Fw e')、拡張後期 (Fw a') 速度、左室流出路血流速度 (LVOT)、を計測した。

3) 血中 RAAS 評価項目

動物が犬座姿勢で頭部が固定されるよう保定し、頸静脈穿刺より採血した。採取後は受託検査業者のマニュアルに従い、全血を EDTA-2Na 管に入れ、速やかに 3000rpm・10 分間の条件下で血漿分離した。血漿は摂氏-20 度以下で冷凍保存し、一週間以内に測定に移した。

測定項目は血漿アンジオテンシン II 濃度 (AT2; Fujifilm Vet Systems, Tokyo, Japan) と血漿アルドステロン濃度 (PAC; Japan Institute for the Control of Aging, NIKKEN SEIL Co., Ltd., Shizuoka, Japan) の二項目とし、いずれも放射

免疫測定法（Radioimmunoassay）にて行った。

4) 統計解析

全ての測定値はノンパラメトリックデータとして扱い、中央値（全範囲）にて表した。

健常若齢犬（YngCtrl）、健常成犬（MatCtrl）の 2 群間での統計的有意差を検出するに Mann-Whitney U 検定を使用した。

また、グループ分けをせず RAAS 活性と月齢、各心臓超音波検査パラメータの相関性を調べるためスピアマンの順位相関係数（ r_s ）を求め、月齢対 AT2、月齢対 PAC それぞれについて線形単回帰分析（Simple linear regression）も実施した。

3. 結果

YngCtrl と MatCtrl 両群それぞれの体重、月齢、心臓超音波検査各パラメータは表 1 にまとめた。集めた健常犬の年齢分布として、YngCtrl が月齢 5.5 (2 - 22) ヲ月、MatCtrl が 132 (45 - 180) ヲ月であった。超音波検査では YngCtrl に比べ MatCtrl の方が、LVIDs、Sep a'、Fw a' は有意に上昇し、E vel と LVOT は有意に低値を示した。5.5 (2 - 22) 132 (45 - 180)

血中 RAAS に関して、YngCtrl と MatCtrl の両群で AT2 は有意差がみられないものの、中央値および第一、第三四分位数ともに MatCtrl のほうが減少傾向にあり (中央値 75 vs. 45 pg/mL ; p=0.6374)、PAC は MatCtrl が YngCtrl より 73%ほど有意に低下した (中央値 26.45 vs. 6.35 pg/mL ; p=0.0098)。(図 1)

相関分析では、AT2 は年齢との相関性が認められなかったことに対し ($r_s = -0.01010$; $R^2 = 0.01019\%$; p= 0.4774)、PAC は加齢とともに有意に減少した ($r_s = -0.3071$; $R^2 = 9.432\%$; p= 0.0386)。(図 2) 心臓超音波検査各パラメータと RAAS 活性の間では、AT2 は LVIDd ($r_s = -0.5138$; p= 0.0171)、A vel ($r_s = -0.4391$; p= 0.0464) と、PAC は FS ($r_s = 0.4737$; p= 0.0300) と有意かつ中程度の相関性を認められた。(表 2)

4. 考察

血中 RAAS を評価したところ、AT2 は相関分析では年齢との相関性が認められなかったものの、24 ヶ月齢を境に YngCtrl、MatCtrl と両分した場合、中央値、第一、第三四分位数ともに MatCtrl のほうが減少傾向にあった。PAC に関しては、相関分析でも群間比較でも一貫して成犬の方が低下を示していた。緒言で記述した通り、ヒトは加齢に伴い RAAS 系の各成分に活性変化がみられており、血中レニン活性およびアルドステロン濃度が低下(Tsunoda et al., 1986) するのに対し、血中アンジオテンシン II 血漿はその減少程度が僅少である (Duggan et al., 1992)。本章ではレニンを組み入れていないが、健常犬のレニン活性を評価した報告では、月齢とレニン活性の間では負の相関性が認められた(Chang et al., 2010)。したがって、RAAS プロファイルの生理的加齢変化は犬もヒトと概ね合致するものと考えられた。このような RAAS における老化現象は、ヒトでは加齢に伴う遺伝子的、エピジェネティック、環境的な因子による腎臓と肝臓の組織学的変化や副腎皮質のアンジオテンシン II 受容体反応性が低下することが一因とされているため(Nanba et al., 2018)、本章で観察された犬 RAAS の加齢変化もヒトと類似したメカニズムに起因すると考察している。また、本章で評価した健常犬集団では収縮機能指標である FS は直接的な強心作用を有しない PAC と正の相関を示し、強心作用を持つ AT2(Mattiazzi, 1997)

とは却って相関性が認められなかった。さらに AT2 は LVIDd と A vel とも有意な負の相関にある所見に関しては、AT2 の心血管系全体に対する総合的な作用の結果であると考えられる。

付随的に、超音波検査では心臓の形態と機能も加齢とともに変化がみられたため以下に記す。MatCtrl における LVIDs の上昇所見は、体重標準化した左室内腔 LVIDDN が両群で有意差がないことから、成長に伴う生理的な内腔拡張を意味すると考えられた。a' の規定因子が心房の機能と左室拡張末期圧によって成り立つとされているが(Maragiannis & Nagueh, 2015)、左室拡張末期圧に関しては前述のように LVIDDN が両群における有意差が認められなかったため、MatCtrl における Sep a' と Fw a' の上昇所見は、心房収縮能が成長と共に発達する結果と考察している。さらに、Fw a' が参考値として報告されている値 11.3 ± 1.9 cm/s は(Lynne O'Sullivan et al., 2007)、本研究の結果（中央値、YngCtrl は 6.2 cm/s、MatCtrl は 10 cm/s）と開きを見受けるが、大型犬であるドーベルマンを対象とした先行文献と小型犬を主な対象とした本研究では対象犬種に相違があり、それによって生じたものと思われる。また、僧帽弁を通る拡張早期血流の最大流速である E vel は、左房室間の圧較差によって定まる(Choong et al., 1988; Firstenberg et al., 2001)。心房収縮能の発達を示唆する MatCtrl での a' 上昇所見と合わせると、MatCtrl は YngCtrl に比較して E vel の低下所見は、

成犬では左室拡張能が成長と共に発達する影響によるものと考えられた。ドプ
ラ像を確認したところ、YngCtrl の波形がすべて層流であったことから、活発
な若齢犬が高めな経大動脈弁流速によって、LVOT が MatCtrl において相対的
に低値を示した正常所見であると思われた。

5. 小括

本章では、2ヶ月齢から12歳まで幅広い年齢層の健常犬を集め、その血中RAAS活性をAT2とPACの二項目にて、心臓超音波検査パラメータと共に評価した。

血中RAAS評価では、AT2は年齢との相関性が評価方法によって認められない、もしくは成犬のほうが減少傾向にあり、PACは評価方法によらず、若齢犬が高めな活性を示し、成長に伴い徐々に低下していくことが判明した。過去の報告に参照して、レニン、AT2、PACの三成分ともに加齢に伴う変化パターンがヒトと類似するものであると結論付けた。

付帯的な所見として、犬は成長に伴って心臓の内腔が生理的に拡大、そして心房収縮能と心室拡張能がともに発達することが心臓超音波検査で判明した。

項目	単位	健常若齢犬 (YngCtrl、 n =12)	健常成犬 (MatCtrl、 n =23)	P 値
体重	kg	3.6 (1.9 - 24)	4.8 (1.2 - 59)	0.2590
月齢	months	5.5 (2 - 22)	132 (45 - 180)	<0.0001
LVIDd	mm	18.5 (16.4 - 40.5)	23.7 (15 - 56.2)	0.0623
LVIDs		8.9 (5.4 - 27)	12.4 (7.1 - 35)	0.0283
FS	%	47.6 (28 - 68)	43.3 (27 - 56.7)	0.0946
LA/Ao		1.06 (0.98 - 1.57)	1.32 (1 - 1.74)	0.0756
E vel	cm/s	86.9 (70.4 - 103)	66.3 (41.4 - 90)	0.0054
A vel	cm/s	58.4 (46.6 - 84.6)	66.6 (44.3 - 127)	0.4952
Sep s'	cm/s	7.6 (6 - 12)	7.9 (6.8 - 13)	0.5168
Fw s'	cm/s	8.3 (4.9 - 10)	8.3 (5.7 - 23)	0.9885
Sep e'	cm/s	6.5 (5 - 11)	7 (3.8 - 11)	0.6767
Fw e'	cm/s	9.4 (6.2 - 13)	8.1 (6.9 - 12)	0.5948
Sep a'	cm/s	5.4 (4.2 - 8.6)	7.4 (5.1 - 9.5)	0.0247
Fw a'	cm/s	6.2 (3.4 - 10)	10 (5.9 - 17)	0.0012
LVOT	cm/s	114 (95.4 - 143)	101 (84.6 - 158)	0.0409
RVOT	cm/s	101 (78.3 - 148)	95 (80 - 132)	0.3177
LVIDDN		0.86 (0.61 - 0.99)	0.76 (0.37 - 1.3)	0.7189

表 1：健常若齢犬と健常成犬のパラメータ。

表記方法は中央値（全範囲）である。

p<0.05 の場合は太字で表示する。

項目	AT2		PAC	
	r_s	P 値	r_s	P 値
LVIDDN	0.166	0.473	-0.208	0.366
LVIDd	-0.514	0.017	-0.337	0.135
LA/Ao	0.007	0.977	-0.207	0.367
FS	0.366	0.102	0.474	0.030
E vel	0.371	0.098	0.275	0.227
A vel	-0.439	0.046	-0.159	0.492
Sep s'	0.061	0.792	0.379	0.090
Fw s'	-0.301	0.185	-0.034	0.884
Sep e'	-0.314	0.166	-0.091	0.696
Fw e'	-0.330	0.145	-0.223	0.331
Sep a'	-0.305	0.178	-0.221	0.335
Fw a'	-0.136	0.555	-0.334	0.139
LVOT	-0.184	0.423	-0.061	0.793
RVOT	-0.340	0.131	0.221	0.336

表 2：健常犬における RAAS 活性と心臓超音波検査パラメータの相関性。

AT2 は LVIDd、A vel と、PAC は FS と有意かつ中程度の相関性を認められた。

$p < 0.05$ のスピアマンの順位相関係数 (r_s) は太字で表示する。

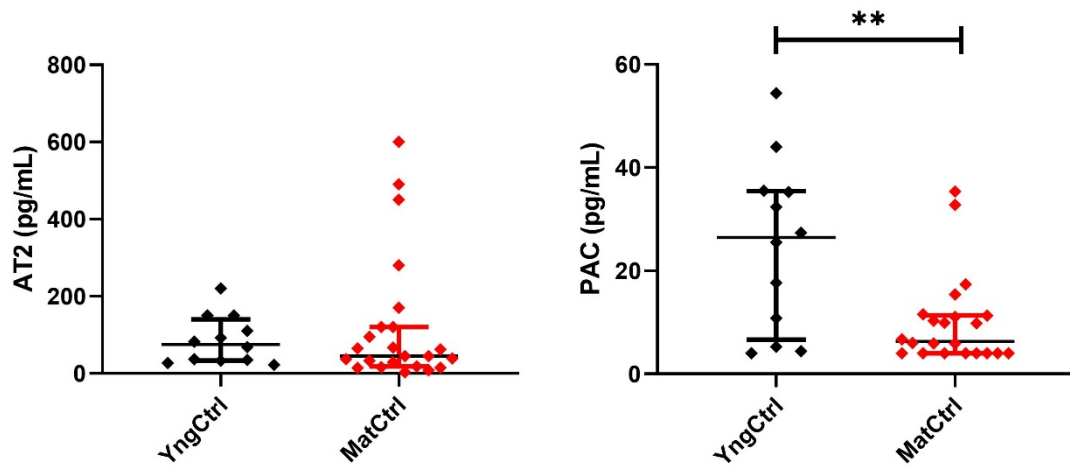


図 1：若齢・高齢別でみる健常犬の RAAS 活性。

グループは左から順に健常若齢犬 (YngCtrl)、健常成犬 (MatCtrl)。AT2 は両グループで変わらず有意差が認められなかったが、中央値および第一、第三四分位数ともに成犬のほうが減少傾向にあった。PAC については有意差が認められ、成犬の中央値が若齢犬の中央値より 73%ほど低下した (26.45 vs. 6.350 pg/mL)。

** p=0.0098

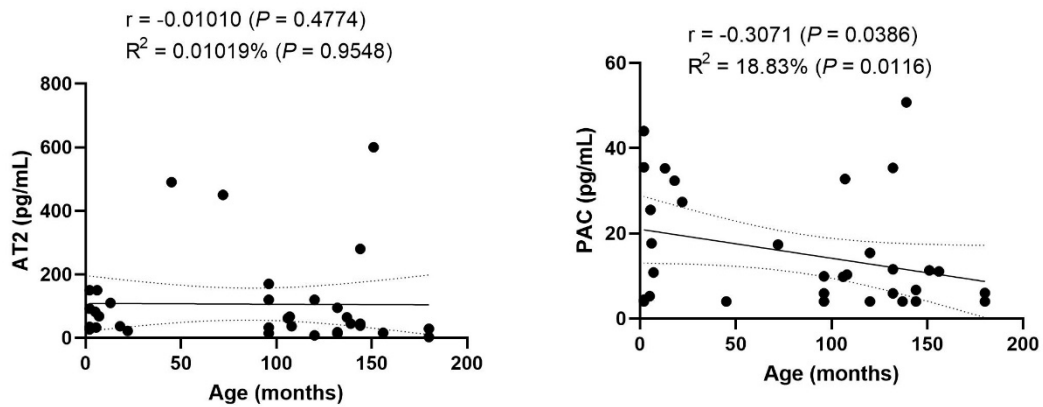


図 2：健康犬における月齢対 RAAS 活性の散布図。

回帰直線で示すように、AT2 は年齢による差が認められなかったことに対し、

PAC は加齢とともに有意に減少した。

第 2 章

犬における動脈管開存症に対する閉鎖術が
レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に与える影響の検討

1. 緒言

動脈管開存症 (Patent ductus arteriosus, PDA) は生後、肺が機能するに伴い 7-10 日間以内に自然閉鎖する肺動脈と大動脈をつなぐ動脈管が新生児初期以降でも開存し続けている状態を指し、若齢犬に好発する先天性心疾患のひとつである (Baumgartner & Glaus, 2003; Tidholm, 1997)。通常、肺循環に対する体循環の圧較差が高いため、左心室から駆出された一回拍出量の一部が動脈管を通し左右方向 (大動脈から肺動脈) へと短絡、過度な肺循環 (pulmonary overcirculation) および左室容量負荷をもたらす (Smolich, 1995)。早期に介入しない場合、前述した病態に対する生体の代償機構が最終的に心筋リモデリングによる著しい左室拡大を及ぼす (Buchanan & Patterson, 2003)。

ヒトでは、先天性心疾患と RAAS 活性の関連性についての研究結果が一致しておらず、先天性心疾患による右心不全に対し RAAS 阻害剤の適用性に関する見解が様々である。Bolger らが先天性心疾患患者を対象に行った研究では、RAAS を含む神経ホルモン系の活性化が具体的な解剖的病変を問わず、心不全の発生において認められていながら (Bolger et al., 2002)、Lemmer らの報告によると、先天性心疾患患者と健常対照群の間でアンジオテンシン II とアルドステロンのレベル差が認められなかった (Lemmer et al., 2011)。しかしながら、PDA 患者を対象として限定すれば、体血流量比 (Q_p/Q_s) および PDA の口径

に比例して重症度が増し、RAAS も活性化すると報告されている (Capozzi & Santoro, 2011)。さらに、PDA を患う新生児における RAAS 活性化は補体系・免疫系のプロテオームレベルでの変化とも関連付けられている (Sellmer et al., 2022)。

ヒト医療で蓄積してきた知見に反して、PDA 罹患犬における RAAS の活性化状況は未だに解明されていない。そこで本章では犬の PDA に対し、手術介入前後の RAAS 活性を評価した。

2. 材料と方法

1) 動物

2021 年 12 月から 2022 年 3 月までの期間に、犬猫こども病院および東京農工大学動物医療センターにて心臓超音波検査により診断された PDA 症例 (PrePDA) 12 頭と、動脈管を外科的閉鎖した一ヶ月後の症例 (PostPDA) 10 頭、計 22 頭を評価対象とした。さらに、その結果を前章で判明した健常若齢犬 (YngCtrl) の測定値と比較した。PDA 症例の犬種はポメラニアン (n=6)、ビション・フリーゼ (n=2)、トイ・プードル (n=1)、雑種 (n=2)、ミニチュア・シュナウザー (n=1) であり、閉鎖術後症例の犬種はポメラニアン (n=5)、ミニチュア・シュナウザー (n=1)、ビション・フリーゼ (n=2)、トイ・プードル (n=1)、雑種 (n=1) であった。

2) 動脈管クリッピング術

本章では PostPDA 群の介入術式として動脈管クリッピング術を採用した。

4) 心臓超音波検査

本章では第 1 章と同様な手法で心臓超音波検査を行った。第 1 章の測定項目に加え、PDA 流速および PDA 口径も評価した。

5) 血中 RAAS 評価項目

本章では第 1 章と同様に、血漿アンジオテンシン II 濃度 (AT2) および血漿アルドステロン濃度 (PAC) を測定した。

6) 統計解析

全ての測定値はノンパラメトリックデータとして扱い、中央値 (全範囲) にて表した。

測定結果は、対照群として第 1 章の健常若齢犬 (YngCtrl) を加えた 3 つのグループに対し、統計的有意差を検出するに Kruskal-Wallis 検定を使用した。

さらに、RAAS 活性と心臓超音波検査パラメータとの相関性を調べるため、スピアマンの順位相関係数 (r_s) を求めた。

3. 結果

YngCtrl、PrePDA、PostPDA 三群それぞれの月齢、体重、心臓超音波検査各パラメータを[表 3](#)にまとめた。PrePDA 群には、PDA 流速 (cm/s) および PDA 最小口径 (mm) も記録している。測定項目のうち、体重、LA/Ao、E vel、A vel、Sep s'、Fw s'、LVOT、RVOT、LVIDDN が群間に有意差が検出され、多重比較法にて有意差を持つ具体的な群の組み合わせは* (対象群と比較) もしくは† (術前後群間で比較) で、その程度はそれぞれの数で表した。

AT2 では、術前後の群 (中央値は PrePDA 群 390 pg/mL、PostPDA 群 295 pg/mL) では有意差を示さなかったものの、両群とも YngCtrl (中央値 82 pg/mL) より有意に上昇した。いっぽう PAC では、PostPDA 群は PrePDA 群に比べ、YngCtrl 犬と統計的有意差がないレベルまで有意に低下 (中央値は PrePDA 群 28.75 pg/mL、PostPDA 群 7.9 pg/mL ; $p=0.0187$) した。[\(図 3\)](#)

相関分析では、E vel は RAAS 活性と中程度の有意な相関性 (AT2 と PAC とそれぞれ、 $r_s=0.460$ 、 $p=0.001$; $r_s=0.428$ 、 $p=0.003$) が認められた。その他 Fw s' と Sep e' も RAAS 活性と、Fw a' は PAC のみと低いながら有意な相関性が検出された。PrePDA 群においては、PDA 流速および PDA 口径のいずれも、RAAS 活性と有意な関係にはなかった。[\(表 4\)](#)

4. 考察

本章では犬の PDA に対し未介入群と、介入後 1 ヶ月群の両集団における RAAS 活性を調べた。介入した集団で術式として採用したクリッピング術は、犬(Takeuchi et al., 2020)だけでなく猫(Ozai et al., 2022)にも適用可能かつ有効な治療法であると報告されており、従来の結紮法と比較して簡便であり所要時間の短縮等の利点が挙げられる。

身体検査では、YngCtrl 群の体重が PrePDA、PostPDA とそれぞれ比較して有意に高値であった。これは YngCtrl 群にフラットコートド・レトリバー (23.4 kg)、グレート・ピレニーズ (23.7 kg)、ラブラドル (21.5 kg) 等大型犬種の外れ値 (Outlier) が含まれていたためであった。この群間体重差は他所見についての解釈にどの程度、影響を及ぼすかは不明だが月齢に関して群間差が認められなかったため ($p=0.0697$)、明らかに体重に依存する形態的測定値 (LVID 等) を除き、RAAS 活性等パラメータでは群間における相互比較性が存続すると思われた。

超音波検査では、YngCtrl に比べ PrePDA 群では有意差のあった LA/Ao と E vel (上昇)、Sep s' (低下) が、術後群では YngCtrl と統計的有意差のないレベルまで有意に変化 (LA/Ao と E vel は低下、Sep s' は上昇) した。また、LVIDDN は YngCtrl に比べ PrePDA と PostPDA がそれぞれ有意な上昇を示し

た。血中 RAAS 活性測定結果から、PrePDA 群において RAAS 活性が惹起されており、PostPDA 群では AT2、PAC ともに減少が見られ、そのうち PAC は正常化と言えるレベルまで低下したことが明らかとなった。さらに、相関分析では RAAS 活性の両指標ともに E vel と有意な相関性を持っていた。上記の所見から、PDA 罹患犬は術前に PDA によって左心系にかかる容量負荷が、閉鎖術後 1 ヶ月の時点で解除され、そのうち特に左房拡大、左房圧指標である E 波流速、左室収縮能指標である Sep s' が正常化を果たした。PDA への介入前後で心臓超音波指標に加え、ナトリウム利尿ペプチドも評価した報告では、術後 1 ヶ月の間 ANP が先行して減少してから、心臓超音波検査で見受けられる正常化を果たした (Asano et al., 1999)。本章では心機能のバイオマーカーを評価していなかったが、同様な推移をたどっていたと考えられる。

補足的な超音波検査所見として、PrePDA での A vel 上昇および Fw s' 低下は、容量負荷による E vel 上昇と収縮能低下による Sep s' 低下、それぞれと並行した結果であり、PostPDA では PrePDA に比較した LVOT 低下は、容量負荷が閉鎖術によって解除されたためであると考えられる。

ヒトの PDA 小児患者では、PDA 重症度に比例して RAAS が活性化すると報告されている (Capozzi & Santoro, 2011) ことに反して、本章で重症度指標として術前評価した PDA 流速と口径のいずれも RAAS 活性と相関が認められなか

ったが、これは 12 頭という少数かつ類似した重症度の症例しか組み入れないため検出できていなかったと考えられる。

本章の制限として、同一集団に対して術前後で評価していないため症例背景の不一致、術後評価のタイミングが 1 ヶ月後という一箇所しかなかったこと、心機能のバイオマーカーが評価されていないことなどが挙げられる。

5. 小括

本章では、犬の PDA に対し手術前後の RAAS 活性化状況を解明することを目的とし、PDA 罹患犬および、動脈管クリッピング術後 1 ヶ月群の RAAS 活性を心臓超音波検査とともに評価した。

第 1 章の健常犬を対照群として比較し、さらに RAAS 活性と心形態機能との相関分析を行った結果、犬の PDA において左心系にかかる容量負荷によって RAAS の活性化が認められ、術後に容量負荷の是正と共に、少なくとも PAC が正常化されることが観察された。

項目	単位	対照群 (YngCtrl, n = 12)	術前群 (PrePDA, n = 12)	術後 1 ヶ月群 (PostPDA, n = 10)	P 値
体重	kg	3.9 (1.9 - 24)	0.74 (0.53 - 5.2)***	0.94 (0.65 - 3)**	<0.0001
月齢	months	5.8 (2 - 45)	2 (1 - 14)	3 (2 - 6)	0.0697
LVIDd	mm	18.5 (16.4 - 40.5)	19.2 (11.4 - 44.7)	17.2 (12.8 - 43.7)	0.3413
LVIDs		8.1 (5.4 - 26.2)	12.4 (6.1 - 35.7)	9.55 (5.9 - 34.3)	0.1338
FS	%	46.9 (27 - 68)	39.8 (20.1 - 63.3)	42.3 (21.5 - 53.9)	0.4250
LA/Ao		1.14 (0.98 - 1.57)	1.44 (1.15 - 2.39)*	1.15 (1 - 1.72)†	0.0024
E vel	cm/s	84.5 (65.5 - 103)	111 (87 - 223)***	86.2 (74.3 - 107)†	0.0002
A vel	cm/s	58.5 (46.6 - 84.6)	83.5 (56.4 - 214)**	64.8 (44 - 79.2)	0.0056
Sep s'	cm/s	7.8 (6 - 12.5)	5.7 (3 - 7.2)**	8.15 (4.2 - 10.1)†	0.0025
Fw s'	cm/s	8.6 (4.9 - 22.6)	6.4 (4.9 - 8.4)*	6.6 (4.9 - 10.5)	0.0157
Sep e'	cm/s	6.5 (5 - 11.4)	7.4 (3.3 - 10.9)	8.25 (5.2 - 9.7)	0.4136
Fw e'	cm/s	9.5 (6.2 - 13.2)	9.2 (4.1 - 17.7)	9.65 (6.7 - 13.2)	0.9222
Sep a'	cm/s	5.5 (4.2 - 8.6)	5.5 (2.6 - 9.7)	6 (5.2 - 10.2)	0.5353
Fw a'	cm/s	6.2 (3.4 - 10.7)	5.7 (3.7 - 11.1)	6.4 (5.4 - 10.7)	0.3580
LVOT	cm/s	113 (95.4 - 143)	139 (94.7 - 179)	97.4 (79.6 - 160)††	0.0041
RVOT	cm/s	101 (78.3 - 148)	109 (71.2 - 128)	96.3 (73.9 - 107)	0.4483
LVIDDN		0.86 (0.61 - 0.99)	1.2 (0.77 - 1.9)***	1.1 (0.81 - 1.6)**	0.0003
PDA 流速	cm/s	-	413.1 (305.9 - 522.8)	-	-
PDA 口径	mm	-	2.13 (1 - 3.6)	-	-

表 3：対照群、術前群、術後 1 ヶ月群間のパラメータ。

表記方法は中央値（全範囲）である。

P 値が 0.05 未満の場合、太字で表示する。

*, **, *** は対照群に比較してそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ を示す。

†, †† は術前群と術後 1 ヶ月群の間で比較してそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ を示す。

項目	AT2		PAC	
	r_s	P 値	r_s	P 値
LVIDd	-0.271	0.063	-0.098	0.508
LVIDs	-0.141	0.341	-0.136	0.356
FS	-0.056	0.704	0.075	0.611
LA/Ao	0.021	0.890	0.093	0.540
E vel	0.460	0.001	0.428	0.003
A vel	0.096	0.522	0.231	0.118
Sep s'	0.001	0.993	-0.231	0.126
Fw s'	-0.310	0.038	-0.301	0.044
Sep e'	0.333	0.025	-0.143	0.350
Fw e'	0.101	0.508	-0.036	0.815
Sep a'	-0.275	0.068	-0.280	0.063
Fw a'	-0.130	0.396	-0.353	0.017
LVOT	-0.069	0.653	0.134	0.379
RVOT	-0.216	0.181	0.002	0.989
LVIDDN	0.275	0.059	0.025	0.865
PDA 流速	0.291	0.357	0.084	0.800
PDA 口径	-0.012	0.971	0.126	0.695

表 4：PDA 罹患犬における RAAS 活性と PDA 口径・流速を含む心臓超音波検査パラメータの相関性。

E vel は RAAS 活性と中程度の有意な相関性が認められた。Fw s' と Sep e' も RAAS 活性と、Fw a' は PAC のみと低いながら有意な相関性が検出された。

PrePDA 群では、PDA 流速および PDA 口径のいずれも、RAAS 活性と有意な関係にはなかった。

$p < 0.05$ のスピアマンの順位相関係数 (r_s) は太字で表示する。

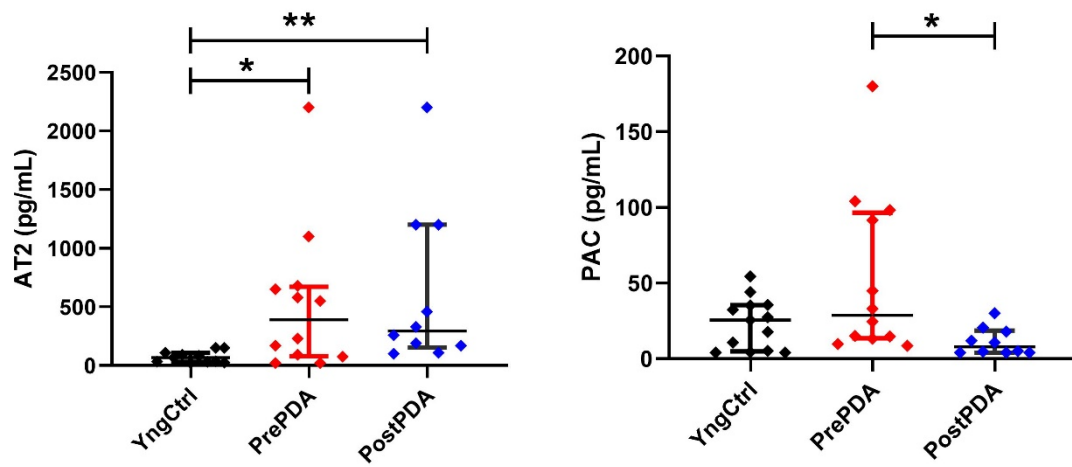


図 3 : PDA 術前後での RAAS 活性。

グループは左から順に健常若齢犬 (YngCtrl)、術前 (PrePDA) 、術後 1 ヶ月 (PostPDA)。AT2 は、術前後の群では有意差を示さなかったものの、両群ともに健常犬より有意に上昇した。PAC は、術後群が術前群に比べ、健常犬と統計的有意差がないレベルまで有意に低下した。

第3章

犬における僧帽弁粘液腫様変性に対する僧帽弁形成術が
レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に与える影響の検討

1. 緒言

犬僧帽弁粘液腫様変性 (Myxomatous mitral valve disease, MMVD) は高齢犬で最もみられる後天性心疾患であり、米国獣医内科学会 (ACVIM) によるステージ分類が広く用いられている (Keene et al., 2019)。僧帽弁に粘液腫様状の病変が生じた Stage B1 から、心拡大 (心臓リモデリング) が認められる Stage B2 を経過し、心不全兆候を示す Stage C・D まで、年単位で緩徐に進行することを特徴とする。

慢性的な容量負荷とともに RAAS 活性化が惹起され、心拡大等病理変化と関連することが知られているが (Ames et al., 2019)、心拡大を有しながらも無徴候段階の Stage B2 に相当する群に、Stage B1 と同様に RAAS が惹起されていない犬もいれば、血中のレニン活性とアルドステロンレベルの上昇が確認される個体も存在すると過去に報告されており (Pedersen et al., 1995)、疾患進行において RAAS が活性化する具体的なタイミングについてまだ不明点が多い。

近年、責任病変である僧帽弁を根治する僧帽弁形成術は、人の弁膜症のみならず MMVD 罹患犬でも長期生命予後に寄与するというエビデンスが蓄積されてきた (Enriquez-Sarano et al., 1995; Kanemoto et al., 2010; Yokoyama et al., 2017)。僧帽弁を外科的に修復後、心臓縮小や機能回復を示す逆リモデリングが認められるものの (Nita et al., 2020; Pandis et al., 2011; Scandura et al., 2012;

Song et al., 2010)、その間の RAAS 変化の過程が明らかにされていない。

さらに、医学領域では心臓外科の術後に RAAS 阻害剤 (ACEi ± ARB ± Eplerenone/Spiroonolactone) を持続投与することによって予後改善に寄与するとの報告があるが (Rodriguez-Gabella et al., 2019)、同様な結論は犬への適用性が不明である。

そこで本章では、MMVD による容量負荷を取り除く外科介入が RAAS 活性に対する影響を、逆リモデリングを呈する術後中期経過にわたって評価した。

2. 材料と方法

1) 動物

白石動物病院にて 2019 年 8 月から 2020 年 4 月までの期間に僧帽弁形成術を受ける MMVD 症例 8 頭の飼育犬に対し、血中 RAAS 活性を術前から術後 3 ヶ月まで等間隔になるよう月ごとに、前向き評価を行った。

MMVD の診断やステージング、手術適用は、罹患犬の病歴、身体検査、血液検査、心電図検査、胸部レントゲン検査、心臓超音波検査等をもって総合的に判断した。

犬種はチワワ(n=3)、キャバリアキングチャールズスパニエル (n=1)、狆(n=1)、雑種 (n=1)、ポメラニアン (n=1)、シーズー (n=1) であった。

2) 僧帽弁形成術

本章では MMVD への介入にあたり腱索再建術式として、まず延伸ポリテトラフルオロエチレン (ePTFE) 製両端針糸 (CV-6; WL Gore & Associates Inc., Flagstaff, AZ, USA) を用いて糸の中央に輪 (一次ループ) を作成、それを乳頭筋に位置するよう、両端針を僧帽弁後尖に縫い付けた。上記の工程は前・後乳頭筋にそれぞれ一次ループを設置するため、計 2 本の CV-6 を使用した。その後、乳頭筋に設置された一次ループに複数の人工腱索となる同材質縫合糸 (二

次ループ) をくぐらせ、僧帽弁前尖辺縁に固定するといった loop-in-loop technique 手法を用いた (Matsuura et al., 2022)。前・後乳頭筋それぞれに設置する人工腱索の具体的な本数や長さ、僧帽弁前尖における具体的な固定領域は、MMVD の変性様式 (逸脱や断裂の箇所) によって決定した。

腱索再建後、拡大した僧帽弁輪に対し modified DeVega 法にて CV-6 もしくは CV-5 系および ePTFE 製プレジエットによる弁輪縫縮術を行った。

4) 心臓超音波検査

心臓超音波検査は第 1、2 章と同様な手法で行った。

5) 血中評価項目

本章では第 1、2 章と同様な AT2、PAC に加え、血中 RAAS 活性測定項目に血漿レニン活性 (PRA; SRL Inc, Tokyo, Japan)、腎機能指標として血中尿素窒素濃度と血漿クレアチニン濃度 (Blood urea nitrogen, BUN と Creatinine; DRI-CHEM 7000, FUJIFILM, Tokyo, Japan) も評価した。

6) 統計解析

全ての測定値はノンパラメトリックデータとして扱い、中央値 (全範囲) に

て表した。

血中 RAAS 活性分析では対照群として第 1 章の健常成犬 (MatCtrl) を加えた計 5 グループ、それ以外の比較では術前 (Baseline) および術後 1、2、3 ヶ月 (Post-1M, 2M, 3M) の計 4 グループに対し、統計的有意差を検出するに
対応のあるデータに対し Friedman 検定、対応のないデータに対し Kruskal-Wallis 検定を行った。

また、心臓超音波検査パラメータと RAAS 数値の関連性を調べるため、スピ
アマンの順位相関係数 (r_s) を求めた。

3. 結果

MMVD 罹患犬の基本情報は表 5 にまとめた。年齢と体重の中央値（範囲）はそれぞれ 10.5（8–14）歳と 5.025（2.4–7）kg で、小型犬である傾向にあった。ACVIM ステージ分類によると、87.5%（7/8 頭）の罹患犬が Stage C であり、残り 1/8 頭はそれぞれ Stage B2 であった。術前までに経口投薬していた薬剤のうち、循環動態に影響しうる利尿剤やカルシウム拮抗薬、RAAS 阻害薬は下記の通りである。3/8 頭がフロセミド、4/8 頭がトラセミド、7/8 頭がピモベンダン、4/8 頭がアンジオテンシン変換酵素阻害剤、1/8 がスピロノラクトン、6/8 頭がアムロジピンをそれぞれ内服処方されていた。術後 2 週間以内に全症例退院されており、退院時に前述した循環動態に影響しうるすべての内服薬は完全休薬していた。

心臓超音波検査では術前に比べ、術後 1 ヶ月で LA/Ao、FS、Fw s'が、術後 2、3 ヶ月で LVIDDN、LA/Ao、FS、E vel、E/A、Sep e'、Fw s'、Fw e'、Fw a'が有意に低下した。全体的に、心臓の形態および機能の改善、すなわち、逆リモデリングが術後 3 ヶ月の間持続していることが確認できた。（表 6）

血中尿素窒素濃度 BUN（中央値 29 vs. 24.9 mg/dl）と血漿クレアチニン濃度 Creatinine（中央値 0.82 vs. 0.6 mg/dl）は、ともに術後 1 ヶ月の時点で術前に比べて有意な低下を示した。（図 4）

RAAS 活性の測定結果としてまず正常群に比べ術前の犬は、PRA が上昇傾向、そして AT2 と PAC がそれぞれ有意に上昇した。次に術前後で比較したところ、PRA と PAC は術前に比べ術後一ヶ月の時点で有意に減少（それぞれ、 $p=0.0018$ 、 $p=0.012$ ）したのに対して、AT2 は術後 3 ヶ月になって初めて有意な低下（ $p=0.0091$ ）を示した。これと関連して、PRA を除き且つ術後 1 ヶ月限定して言えば、同様な結果は第 2 章の PDA 閉鎖術後でも確認された。（[図 5](#)）

心臓超音波と RAAS 活性の各パラメータの関連分析では、複数の心形態および機能指標と RAAS の指標の間で低から中程度でありながら有意な関連性が認められた。PRA は LVIDDN、LA/Ao、FS、E vel、E/A、Sep e'、Fw e' と（ $r_s=0.371, 0.466, 0.42, 0.465, 0.458, 0.503, 0.623; p<0.05$ ）、AT2 は LVIDDN、Sep s'、Sep e'、Fw s'、Fw e'（ $r_s=0.355, 0.426, 0.487, 0.347, 0.513; p<0.05$ ）と、PAC は E vel および E/A（ $r_s=0.359, 0.576; p<0.05$ ）と、それぞれ正の相関があった。（[表 7](#)）

4. 考察

本章では犬の MMVD に対する僧帽弁形成術が RAAS に与える影響を解明することを目的とした検討を行った。この情報をもって RAAS を最適制御することによって、犬の僧帽弁形成術後における心臓回復過程ないし臨床転帰の向上に資すると考えられる。医学領域では術後における RAAS 抑制の必要性に関して賛否両論あり (Goel et al., 2020; Rodriguez-Gabella et al., 2019; Yiu et al., 2014)、本章で判明した知見は獣医療での心臓外科術後において、さらなる RAAS 抑制をすべきかを検討する上で有益な情報となる。

まず、MMVD 罹患犬は正常対象群である MatCtrl に比べ RAAS が活性化するという既存の知見と一致する結果を再確認できた。続いて僧帽弁形成術を受けた犬においては、①術後 1 ヶ月の時点から 3 ヶ月まで持続的な逆リモデリングを見せたこと (表 5)、②その逆リモデリングを示す心臓超音波検査指標と RAAS 活性の間で有意な関連性を持っていることから (表 6)、評価項目によって所要時間が異なるが、RAAS 活性も最終的に逆リモデリングと共に正常に近づくことが判明した。補足として、第 2 章で PDA 閉鎖術後 1 ヶ月の時点の AT2 が有意に減少しなかったのは、本章のように観察期間を延長することにより有意差を示してくる可能性も示唆された。また、僧帽弁形成術前に急性腎障害を呈した症例報告では、術後に二日目に RAAS 活性の低下が記録されている

(Matsuura et al., 2021)ため、本章で観察された弁形成の RAAS に与える緩和効果は術直後（数日程度）に顕す可能性が示唆された。

しかしながら、第 1 章の MatCtrl 測定値ならびに他報告にて健常犬を用いた参考値と比較検討したところ（PRA 中央値, 0.89-2.5 ng/mL/hr; AT2 平均値, 14-20 pg/mL; PAC 中央値, 14.5-61 pg/mL）（Koch et al., 1995; Luchner et al., 1996; Pedersen et al., 1995; Sakamoto et al., 2020）、僧帽弁形成術後 3 ヶ月では本章の犬の RAAS 活性は正常に近づいているものの、完全な正常化までには至らなかった。ただし、サンプリング手法や測定方法の相違等により、他報告の測定値との相互比較性が完全には保証されないところに注意が必要である。

一方、心臓超音波検査では術前の心拡大が、より進んだ正常化を示した。この逆リモデリングは、Stage B2 の基準である LVIDDN \geq 1.7 および LA/Ao \geq 1.6 より下回る（Keene et al., 2019）、すなわち、投薬を要しないレベルまで正常化を果たしたため、僧帽弁形成術後に RAAS 阻害薬等、循環器関連薬剤の休薬の妥当性を支持するものであると考えられた。

医学領域では、循環動態を機械的補助介入後に組織レベルの RAAS 持続活性化が認められることがあり（Klotz et al., 2009; Klotz et al., 2005）、心血管外科の術後には RAAS に対する薬物拮抗が予後改善に寄与すると結論付けられている報告も散見される（Briasoulis et al., 2020; Dandel & Hetzer, 2018; Goel et al.,

2020; Klotz et al., 2007; Rodriguez-Gabella et al., 2019; Yiu et al., 2014)。本章では局所ではなく循環中の RAAS 活性しか評価していないため、心臓組織内では血中の RAAS 活性に比例しない可能性も考えられる。本章で評価した犬の術後 3 ヶ月の時点で血中 RAAS 活性が正常参考値に達していない所見（PRA 中央値 2.75 ng/mL/h、AT2 中央値 235 pg/mL、PAC 中央値 54.62 pg/mL）が持つ予後的意義に関しては、犬僧帽弁形成術後集団を用いた更なる長期的なランダム化比較試験にて解明する必要がある。

最後に、図 5 の結果は見方を変えれば、手術を受けない MMVD 症例にとっても有意義なものとなりうる。前述した表 6 に示している心臓超音波検査指標と RAAS 活性の間での相関性が時系列順を問わず成立する。そこで、図 5 の時間軸を反転してみると、MMVD が StageB1 からスタートし、心拡大ないし肺水腫等経過をたどり、すなわち、軽症から重症へと自然発症の MMVD 症例における RAAS 活性動態を反映するものとみなすことができる。間接的ではあるが、この視点は RAAS 活性と心臓リモデリングの関連性を支持するものである。さらに、この情報は症状発現前の段階で RAAS が活性化する時期を示唆しており、自然発症の MMVD 罹患犬に対し、RAAS 阻害薬を開始すべきタイミングを決定する際に臨床的な意義として有益である可能性がある。

以上の結果より、犬の代表的な循環器疾患である MMVD に対する根治手術

後では、成分によって数ヶ月程度を要するが、RAAS 活性が最終的に低下することが判明した。また、第2章で PDA 閉鎖術後一ヶ月の時点の AT2 が有意に減少しなかったのは、本章のように観察期間を延長することにより有意差を示してくる可能性が示唆された。

本章の制限として、症例数の少なさ、症例の異質性（犬種、体重、投薬歴、食事内容、MMVD ステージ等）、サンプリングから測定までの時間差、概日リズム中のサンプリング時間の不一致などが挙げられる。

5. 小括

本章では、MMVD 罹患犬が外科介入を受けた前後の RAAS 活性化状況を説明することを目的とし、研究デザインとして MMVD を患う 8 頭の犬を対象に、術前から術後 3 ヶ月までの RAAS 活性を前向きに検討した。その結果を対照群と比較したところ、犬の MMVD において活性化した RAAS が僧帽弁形成術によって、正常化まで達していないものの、休薬できるほど全体的に緩和されることが判明した。

犬種	性別	年齢 (年)	体重 (kg)	ACVIM Stage	循環器投薬 (mg/kg)	退院 日数 (day)
雑種	去勢雄	10	5.6	C	Torsemide 0.09 q24h, Pimobendan 0.44 q12h, Amlodipine 0.22 q12h	6
ポメラニアン	避妊雌	12	4.45	C	Furosemide 1.1 q12h, Pimobendan 0.56 q12h, Amlodipine 0.56 q24h	6
狆	雄	8	7	B2	Pimobendan 0.36 q12h, Amlodipine 0.14 q12h	6
チワワ	避妊雌	10	4	C	Torsemide 0.05 q24h, Amlodipine 0.47 q24h	6
チワワ	雄	10	4.15	C	Torsemide 0.1 q12h, Pimobendan 0.3 q12h, Benazepril 0.3 q12h	8
チワワ	雄	14	2.4	C	Furosemide 1.5 q12h, Pimobendan 0.5 q12h, Alacepril 1.0 q12h, Spironolactone 2.0 q12h, Amlodipine 0.1 q24h	10
CKCS	去勢雄	11	6.95	C	Torsemide 0.1 q24h, Pimobendan 0.45 q8h, Alacepril 1.5 q12h, Amlodipine 0.1 q24h	6
シーズー	去勢雄	11	6.8	C	Furosemide 2.0 q12h, Pimobendan 0.37 q12h, Benazepril 0.37 q12h	12

表 5：僧帽弁形成術を受ける直前の MMVD 罹患犬の症例情報 (n=8)。

CKCS はキャバリア・キング・チャールズ・スパニエルの略である。

項目	単位	術前	術後			P 値
			1 ヶ月	2 ヶ月	3 ヶ月	
BW	kg	5.05 (2.5–8.6)	4.82 (2.66–8.05)	4.87 (2.58–8.3)	4.75 (2.74–8.32)	0.076
LVIDd	mm	34.5 (26.7–42.2)	26.5 (19.4–34.4)	25.7 (16.1–36.8)*	22.6 (17.4–34.2)***	< 0.001
LVIDDN		2.13 (1.76–2.33)	1.64 (1.45–1.96)	1.62 (1.21–1.97)*	1.45 (1.22–1.83)***	< 0.001
LA/Ao		2.21(1.92–2.51)	1.38 (1.19–1.77)*	1.25 (1–1.46)***	1.39 (1–1.71)	< 0.001
FS (%)	%	49.7 (35.4–59.2)	33.4 (19.6–55)*	36.5 (23.5–50.2)*	34.3 (20.1–52.9)*	0.0064
E vel	cm/s	121.7(107–164)	82.8 (53–123)	81.8 (49–99.5)**	74.7 (60.6–90.2)*	0.0034
E/A		1.3 (0.95–2.88)	0.66 (0.44–1.05)	0.64 (0.38–1.18)*	0.78 (0.57–1.18)*	0.0099
Sep s'	cm/s	7.9 (5.1–12.8)	6.30 (4.2–8.6)	5.60 (4.7–9)	4.42 (3.6–6.3)** †	0.0027
Sep e'	cm/s	6.3 (5.1–11.9)	4.7 (3.2–7.8)	4.2 (2.7–6.8)*	3.6 (2.3–9.4)**	0.0017
Sep a'	cm/s	5.90 (2.6–9.9)	5.40 (3.5–8.2)	4.55 (2.9–8)	4.85 (2.4–6.2)	0.1
Fw s'	cm/s	10.15 (7.1–12.2)	5.95 (3.6–8.1)*	5.25 (4.4–7.7)	4.73 (3.4–6.5)***	< 0.001
Fw e'	cm/s	8.1 (7–10)	5.3 (3.2–8.2)	5.0 (3.2–9)	4.2 (2.7–5.9)**	0.0091
Fw a'	cm/s	8.2 (4.5–11.9)	5.75 (2.9–8.5)	6.25 (3.5–7.8)	4.55 (3.2–5.5)*	0.034

表 6：僧帽弁形成術を受ける MMVD 罹患犬 (n=8) の術前および術後 1、2、3 ヶ月の心臓超音波検査結果。

表記方法は中央値（範囲）である。

*, **, *** は術前群に比較してそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ を示す。

† は術後 1 ヶ月群と術後 2 ヶ月もしくは術後 3 ヶ月群の間で比較して $p < 0.05$ を示す。術後 2 ヶ月群と術後 3 ヶ月群の間で有意差が検出されなかった。

心臓の形態および機能の改善、すなわち、逆リモデリングが術後 3 か月の間、持続していることが確認できた。

項目	PRA		AT2		PAC	
	r_s	P 値	r_s	P 値	r_s	P 値
LVIDDN	0.371*	0.036	0.355*	0.047	0.333	0.062
LA/Ao	0.466**	0.007	0.231	0.2	0.242	0.18
FS	0.420*	0.017	0.027	0.89	0.266	0.14
E	0.465**	0.007	0.179	0.33	0.359*	0.04
E/A	0.458**	0.008	0.133	0.47	0.576**	0.001
S' sep	0.296	0.1	0.426*	0.015	0.086	0.64
E' sep	0.533**	0.002	0.487**	0.005	0.143	0.43
A' sep	-0.041	0.82	0.008	0.97	-0.061	0.74
S' lat	0.360*	0.04	0.347*	0.048	0.174	0.34
E' lat	0.623***	0.0001	0.513**	0.003	0.172	0.35
A' lat	0.077	0.67	0.199	0.27	-0.055	0.76

表 7：僧帽弁形成術を受ける MMVD 罹患犬の心臓超音波検査数値と RAAS 活性間の関連分析結果。

RAAS 活性指標である PRA、AT2、PAC と各心臓超音波測定値それぞれのスピアマンの順位相関係数 (r_s) を表している。

*, **, *** はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ の r_s を示し、太字で表示する。

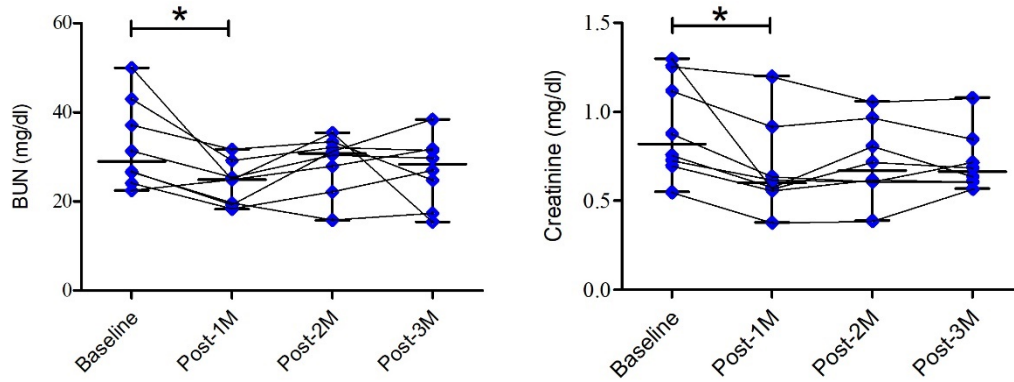


図 4：僧帽弁形成術を受ける MMVD 罹患犬 (n=8) の術前 (Baseline) および

術後 1、2、3 ヶ月 (Post-1M, -2M, -3M) の血中腎機能指標推移。

各時点のデータを結ぶ線は同一の症例のものであることを示す。

*は $p < 0.05$ を示す。

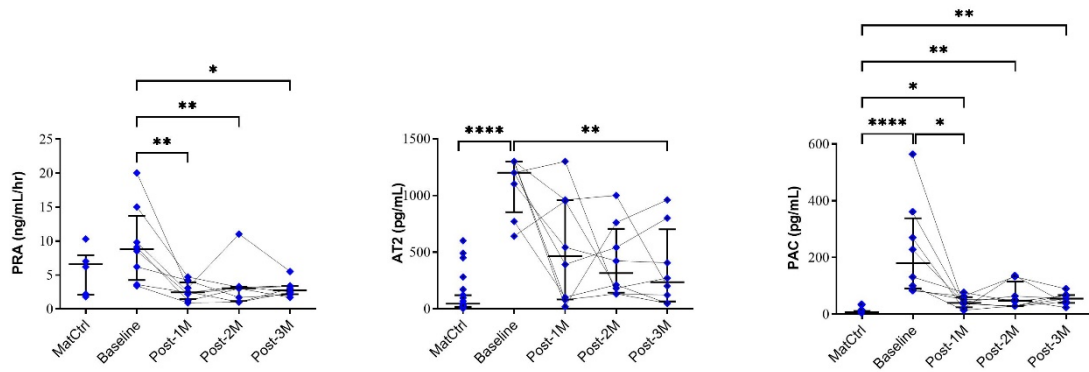


図5：健常成犬（MatCtrl、n=23）および僧帽弁形成術を受けるMMVD罹患犬（n=8）の術前（Baseline）、術後1、2、3ヵ月（Post-1M、-2M、-3M）の血中RAAS活性推移。

各時点のデータを結ぶ線が存在する場合は同一の症例のものであることを示す。

*, **, **** はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$ を示す。

総括

本研究では、獣医療臨床でよく遭遇する循環器疾患の外科的治療介入前後での RAAS 活性の変化を明らかにした。第 1 章では、健常犬は年齢によって差があることを示した。第 2 章では、若齢犬で好発する PDA では術後 1 ヶ月に AT2 が緩和、PAC が正常化すること、第 3 章では、高齢犬で好発する MMVD では術後 3 ヶ月を通して全体的に緩和することを解明した。

RAAS に対し深まった理解は、今後臨床家が RAAS の活性化を制御する際、最適化の精度の向上、循環器疾患を患う動物の QOL や生存率を上げる一助となると考えられる。

また、本研究で得られた知見は今後、獣医療で増えていくであろう循環器疾患の術後集団を対象とした診療マニュアルの確立に資することが期待される。

謝辞

本論文は筆者が日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻教授 亘敏広 先生および東京農工大学獣医外科学研究室教授 田中綾先生には本研究の実施の機会・環境を与えていただくとともに、また、その遂行にあたり終始懇篤なるご指導を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

また本研究を進めるにあたりご協力いただいた VCA 白石動物病院 松浦功泰先生、帯広畜産大学動物医療センター 吉田智彦准教授、東京農工大学訪問研究員 Ahmed Said Mandour 先生、東京農工大学農学研究院 島田香寿美助教、本学獣医放射線学研究室 合屋征二郎助教に深謝致します。

さらに大学院において生活面および異なる研究テーマの遂行にあたり、お力添えいただいた本学獣医病理学研究室 渋谷久教授、本学獣医生理学研究室 鯉江洋教授、東京農工大学産官学連携研究員 田中隆志先生、東京農工大学工学研究院 朝倉哲郎名誉教授、東京農工大学朝倉哲郎研究室研究員 鈴木育絵氏に感謝の意を表します。

日々臨床と研究で多忙を極める中、協力を惜しまず手を貸してくださった同獣医内科学研究室 中澤慈先生、東京農工大学獣医外科学研究室 竹内亜樹先生、小材祐介先生、濱部理奈特任助教、廣瀬碧紀先生、Hanan Attia 先生、Hussein

Elhusseiny 先生、横井愛美先生、長谷川瑞希先生、渡辺桃子先生ならびにその他研修医、学部学生各位に深謝致します。

最後に、日本に留学する以前から現在まで、日本語を母語としない故、周りとの意思疎通が困難な中、精神的に支えとなってくださった父・鄭維佳、母・劉麗卿、パートナー・新垣夏美にこの場をお借りして改めて感謝申し上げます。

引用文献

1. Ames, M. K., Atkins, C. E., & Pitt, B. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*, *33*(2), 363-382. <https://doi.org/10.1111/jvim.15454>
2. Asano, K., Kadosawa, T., Okumura, M., & Fujinaga, T. (1999). Peri-operative changes in echocardiographic measurements and plasma atrial and brain natriuretic peptide concentrations in 3 dogs with patent ductus arteriosus. *J Vet Med Sci*, *61*(1), 89-91. <https://doi.org/10.1292/jvms.61.89>
3. Baumgartner, C., & Glaus, T. M. (2003). [Congenital cardiac diseases in dogs: a retrospective analysis]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, *145*(11), 527-533, 535-526. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.145.11.527> (Angeborene Herzerkrankungen beim Hund: Eine retrospektive Analyse.)
4. Belmin, J., Levy, B. I., & Michel, J. B. (1994). Changes in the renin-angiotensin-aldosterone axis in later life. *Drugs Aging*, *5*(5), 391-400. <https://doi.org/10.2165/00002512-199405050-00007>
5. Bolger, A. P., Sharma, R., Li, W., Leenarts, M., Kalra, P. R., Kemp, M., Coats, A. J., Anker, S. D., & Gatzoulis, M. A. (2002). Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation*, *106*(1), 92-99. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000020009.30736.3f>
6. Briasoulis, A., Ruiz Duque, E., Mouselimis, D., Tsarouchas, A., Bakogiannis, C., & Alvarez, P. (2020). The role of renin-angiotensin system in patients with left ventricular assist devices. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, *21*(4), 1470320320966445. <https://doi.org/10.1177/1470320320966445>
7. Buchanan, J. W., & Patterson, D. F. (2003). Etiology of patent ductus arteriosus in dogs. *J Vet Intern Med*, *17*(2), 167-171. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02429.x>
8. Capozzi, G., & Santoro, G. (2011). Patent ductus arteriosus: patho-physiology, hemodynamic effects and clinical complications. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *24 Suppl 1*, 15-16. <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.607564>
9. Chang, Y. J., Chan, I. P., Cheng, F. P., Wang, W. S., Liu, P. C., & Lin, S. L. (2010). Relationship between age, plasma renin activity, and renal resistive index in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, *51*(3), 335-337. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2010.01669.x>
10. Choong, C. Y., Abascal, V. M., Thomas, J. D., Guerrero, J. L., McGlew, S., & Weyman, A. E. (1988). Combined influence of ventricular loading and relaxation on the transmitral flow velocity profile in dogs measured by Doppler echocardiography. *Circulation*, *78*(3), 672-683. <https://doi.org/10.1161/01.cir.78.3.672>

11. Dandel, M., & Hetzer, R. (2018). Recovery of failing hearts by mechanical unloading: Pathophysiologic insights and clinical relevance. *Am Heart J*, *206*, 30-50. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2018.09.004>
12. Duggan, J., Kilfeather, S., O'Brien, E., O'Malley, K., & Nussberger, J. (1992). Effects of aging and hypertension on plasma angiotensin II and platelet angiotensin II receptor density. *Am J Hypertens*, *5*(10), 687-693. <https://doi.org/10.1093/ajh/5.10.687>
13. Egenvall, A., Bonnett, B. N., & Häggström, J. (2006). Heart Disease as a Cause of Death in Insured Swedish Dogs Younger Than 10 Years of Age. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *20*(4), 894-903. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01803.x>
14. Enriquez-Sarano, M., Schaff, H. V., Orszulak, T. A., Tajik, A. J., Bailey, K. R., & Frye, R. L. (1995). Valve repair improves the outcome of surgery for mitral regurgitation. A multivariate analysis. *Circulation*, *91*(4), 1022-1028. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.4.1022>
15. Firstenberg, M. S., Smedira, N. G., Greenberg, N. L., Prior, D. L., McCarthy, P. M., Garcia, M. J., & Thomas, J. D. (2001). Relationship between early diastolic intraventricular pressure gradients, an index of elastic recoil, and improvements in systolic and diastolic function. *Circulation*, *104*(12 Suppl 1), I330-335. <https://doi.org/10.1161/hc37t1.094834>
16. Goel, S. S., Kleiman, N. S., Zoghbi, W. A., Reardon, M. J., & Kapadia, S. R. (2020). Renin-Angiotensin System Blockade in Aortic Stenosis: Implications Before and After Aortic Valve Replacement. *J Am Heart Assoc*, *9*(18), e016911. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016911>
17. Inoue, M., & Sugiura, K. (2022). Analysis of Life Expectancy and Causes of Death of Dogs and Cats in Japan Based on Veterinary Medical Record Data. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, *75*(6), e128-e133. <https://doi.org/10.12935/jvma.75.e128>
18. Kanemoto, I., Taguchi, D., Yokoyama, S., Mizuno, M., Suzuki, H., & Kanamoto, T. (2010). Open heart surgery with deep hypothermia and cardiopulmonary bypass in small and toy dogs. *Vet Surg*, *39*(6), 674-679. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2010.00687.x>
19. Keene, B. W., Atkins, C. E., Bonagura, J. D., Fox, P. R., Haggstrom, J., Fuentes, V. L., Oyama, M. A., Rush, J. E., Stepien, R., & Uechi, M. (2019). ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med*, *33*(3), 1127-1140. <https://doi.org/10.1111/jvim.15488>
20. Kerstens, M. N., Kobold, A. C., Volmer, M., Koerts, J., Sluiter, W. J., & Dullaart, R. P. (2011). Reference values for aldosterone-renin ratios in normotensive individuals and effect of changes in dietary sodium consumption. *Clin Chem*, *57*(11), 1607-1611.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.165662>

21. Klotz, S., Burkhoff, D., Garrelts, I. M., Boomsma, F., & Danser, A. H. (2009). The impact of left ventricular assist device-induced left ventricular unloading on the myocardial renin-angiotensin-aldosterone system: therapeutic consequences? *Eur Heart J*, *30*(7), 805-812. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp012>
22. Klotz, S., Danser, A. H., Foronjy, R. F., Oz, M. C., Wang, J., Mancini, D., D'Armiento, J., & Burkhoff, D. (2007). The impact of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on the extracellular collagen matrix during left ventricular assist device support in patients with end-stage heart failure. *J Am Coll Cardiol*, *49*(11), 1166-1174. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.10.071>
23. Klotz, S., Foronjy, R. F., Dickstein, M. L., Gu, A., Garrelts, I. M., Danser, A. H., Oz, M. C., D'Armiento, J., & Burkhoff, D. (2005). Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness. *Circulation*, *112*(3), 364-374. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.515106>
24. Koch, J., Pedersen, H. D., Jensen, A. L., Flagstad, A., & Poulsen, K. (1995). Activation of the renin-angiotensin system in dogs with asymptomatic and symptomatic dilated cardiomyopathy. *Res Vet Sci*, *59*(2), 172-175. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90055-1)
25. Lemmer, J., Heise, G., Rentzsch, A., Boettler, P., Kuehne, T., Dubowy, K. O., Peters, B., Lemmer, B., Hager, A., Stiller, B., & German Competence Network for Congenital Heart, D. (2011). Right ventricular function in grown-up patients after correction of congenital right heart disease. *Clin Res Cardiol*, *100*(4), 289-296. <https://doi.org/10.1007/s00392-010-0241-8>
26. Luchner, A., Stevens, T. L., Borgeson, D. D., Redfield, M. M., Bailey, J. E., Sandberg, S. M., Heublein, D. M., & Burnett, J. C., Jr. (1996). Angiotensin II in the evolution of experimental heart failure. *Hypertension*, *28*(3), 472-477. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.28.3.472>
27. Lynne O'Sullivan, M., O'Grady, M. R., & Minors, S. L. (2007). Assessment of Diastolic Function by Doppler Echocardiography in Normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *21*(1). [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[81:Aodfbd\]2.0.Co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[81:Aodfbd]2.0.Co;2)
28. Maragiannis, D., & Nagueh, S. F. (2015). Echocardiographic evaluation of left ventricular diastolic function: an update. *Curr Cardiol Rep*, *17*(2), 3. <https://doi.org/10.1007/s11886-014-0561-9>
29. Matsuura, K., Yoshida, T., Uehara, T., Yamada, S., Yotsuida, H., Hasegawa, M., Katayose, S.,

- Yamada, K., & Yaginuma, Y. (2021). Metabolic alkalosis following mitral valvuloplasty in a dog with preoperative acute kidney injury. *J Am Vet Med Assoc*, *259*(11), 1332-1336. <https://doi.org/10.2460/javma.20.09.0519>
30. Matsuura, K., Yoshida, T., Yamada, S., Aboshi, Y., Yotsuida, H., Yaginuma, Y., & Hasegawa, M. (2022). The outcome of surgical mitral valve repair with loop-in-loop technique in dogs with different stage myxomatous mitral valve disease. *J Vet Cardiol*, *42*, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2022.06.001>
31. Mattiazzi, A. (1997). Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca²⁺ or changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness? *J Pharmacol Toxicol Methods*, *37*(4), 205-214. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(97\)00020-8](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(97)00020-8)
32. Nakagawa, P., Gomez, J., Grobe, J. L., & Sigmund, C. D. (2020). The Renin-Angiotensin System in the Central Nervous System and Its Role in Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep*, *22*(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-1011-2>
33. Nanba, K., Vaidya, A., & Rainey, W. E. (2018). Aging and Adrenal Aldosterone Production. *Hypertension*, *71*(2), 218-223. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10391>
34. Nita, N., Scharnbeck, D., Schneider, L. M., Seeger, J., Wohrle, J., Rottbauer, W., Kessler, M., & Markovic, S. (2020). Predictors of left ventricular reverse remodeling after percutaneous therapy for mitral regurgitation with the MitraClip system. *Catheter Cardiovasc Interv*, *96*(3), 687-697. <https://doi.org/10.1002/ccd.28779>
35. Ozai, Y., Uemura, A., Tanaka, R., Takeuchi, A., Hamabe, L., Shimada, K., Yokoi, A., Hirose, M., Watanabe, M., & Uehara, K. (2022). Clip ligation for treatment of patent ductus arteriosus occlusion in three cats. *J Vet Sci*, *23*(4), e39. <https://doi.org/10.4142/jvs.21314>
36. Pandis, D., Grapsa, J., Athanasiou, T., Punjabi, P., & Nihoyannopoulos, P. (2011). Left ventricular remodeling and mitral valve surgery: prospective study with real-time 3-dimensional echocardiography and speckle tracking. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *142*(3), 641-649. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.11.030>
37. Pedersen, H. D., Koch, J., Poulsen, K., Jensen, A. L., & Flagstad, A. (1995). Activation of the renin-angiotensin system in dogs with asymptomatic and mildly symptomatic mitral valvular insufficiency. *J Vet Intern Med*, *9*(5), 328-331. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1995.tb01092.x>
38. Rodriguez-Gabella, T., Catala, P., Munoz-Garcia, A. J., Nombela-Franco, L., Del Valle, R., Gutierrez, E., Regueiro, A., Jimenez-Diaz, V. A., Ribeiro, H. B., Rivero, F., Fernandez-Diaz, J. A., Pibarot, P., Alonso-Briales, J. H., Tirado-Conte, G., Moris, C., Diez Del Hoyo, F., Jimenez-Britez, G., Zaderenko, N., Alfonso, F., . . . Amat-Santos, I. J. (2019).

- Renin-Angiotensin System Inhibition Following Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol*, 74(5), 631-641. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.05.055>
39. Sakamoto, Y., Sakai, M., Sato, K., & Watari, T. (2020). Plasma renin activity and aldosterone concentration in dogs with acquired portosystemic collaterals. *J Vet Intern Med*, 34(1), 139-144. <https://doi.org/10.1111/jvim.15661>
 40. Scandura, S., Ussia, G. P., Capranzano, P., Caggi, A., Sarkar, K., Cammalleri, V., Mangiafico, S., Chiaranda, M., Imme, S., Di Pasqua, F., Pistrutto, A. M., Millan, G., & Tamburino, C. (2012). Left cardiac chambers reverse remodeling after percutaneous mitral valve repair with the MitraClip system. *J Am Soc Echocardiogr*, 25(10), 1099-1105. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2012.07.015>
 41. Schrier, R. W., & Abraham, W. T. (1999). Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*, 341(8), 577-585. <https://doi.org/10.1056/NEJM199908193410806>
 42. Sellmer, A., Henriksen, T. B., Palmfeldt, J., Bech, B. H., Astono, J., Bennike, T. B., & Hjortdal, V. E. (2022). The Patent Ductus Arteriosus in Extremely Preterm Neonates Is More than a Hemodynamic Challenge: New Molecular Insights. *Biomolecules*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/biom12091179>
 43. Smolich, J. J. (1995). Ultrastructural and functional features of the developing mammalian heart: a brief overview. *Reprod Fertil Dev*, 7(3), 451-461. <https://doi.org/10.1071/rd9950451>
 44. Song, B. G., On, Y. K., Jeon, E. S., Kim, D. K., Lee, S. C., Park, S. W., Oh, J. K., Sung, K. I., & Park, P. (2010). Atrioventricular reverse remodeling after valve repair for chronic severe mitral regurgitation: 1-year follow-up. *Clin Cardiol*, 33(10), 630-637. <https://doi.org/10.1002/clc.20782>
 45. Takeuchi, A., Uemura, A., Goya, S., Shimada, K., Yoshida, T., Hara, S., Sato, K., Shiraishi, K., Yairo, A., Kto, K., Matsuura, K., & Tanaka, R. (2020). The utility of patent ductus arteriosus closure with hemostatic clip in dogs. *Pol J Vet Sci*, 23(2), 255-260. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.133640>
 46. Tidholm, A. (1997). Retrospective study of congenital heart defects in 151 dogs. *J Small Anim Pract*, 38(3), 94-98. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1997.tb03326.x>
 47. Tsunoda, K., Abe, K., Goto, T., Yasujima, M., Sato, M., Omata, K., Seino, M., & Yoshinaga, K. (1986). Effect of age on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal subjects: simultaneous measurement of active and inactive renin, renin substrate, and aldosterone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 62(2), 384-389. <https://doi.org/10.1210/jcem-62-2-384>
 48. Weidmann, P., De Myttenaere-Bursztein, S., Maxwell, M. H., & de Lima, J. (1975). Effect on

- aging on plasma renin and aldosterone in normal man. *Kidney Int*, 8(5), 325-333.
<https://doi.org/10.1038/ki.1975.120>
49. Yiu, K. H., Ng, W. S., Chan, D., Sit, K. Y., Wong, A., Lee, C. W., Chum, H. L., Cheng, W. Y., Pun, C. T., Ho, K. L., Chen, Y., Ho, L. M., Kumana, C. R., Cheung, H. L., Chung, M. C., Lau, C. P., Au, W. K., & Tse, H. F. (2014). Improved prognosis following renin-angiotensin-aldosterone system blockade in patients undergoing concomitant aortic and mitral valve replacement. *Int J Cardiol*, 177(2), 680-682.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.09.163>
50. Yokoyama, S., Kanemoto, I., Mihara, K., Ando, T., Kawase, K., Sahashi, Y., & Iguchi, K. (2017). Treatment of severe mitral regurgitation caused by lesions in both leaflets using multiple mitral valve plasty techniques in a small dog. *Open Vet J*, 7(4), 328-331.
<https://doi.org/10.4314/ovj.v7i4.7>