様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２６ 日現在

機関番号：３２７０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５８０４４９
研究課題名（和文）犬の僧帽弁閉鎖不全症における心不全治療薬の自律神経機能改善効果の比較

研究課題名（英文）The effects of various heart failure medications on heart rate variability and renin-angiotensin aldosterone system in dogs with mitral regurgitation.

研究代表者
藤井　洋子（FUJII, Yoko）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：１０３１８８８４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,000,000円、（間接経費）　　600,000円

研究成果の概要（和文）：　僧帽弁閉鎖不全（MR)犬において、利尿剤と心不全治療薬を組み合わせて投与し、自律神経機能およびレニン・アンジオテンシン・アルドステロン（RAA）系に対する影響を検討した。
　実験的MR犬5頭を使用し、プラセボ群、フロセミド群、フロセミド＋ピモベンダン、ピモベンダン＋エナラプリル、アゾセミド群をおき、心拍変動解析および尿中アルドステロン・クレアチニン比を比較した。その結果、心拍変動の各パラメータにおいて、各群間に有意な差が認められなかった。フロセミドによりRAA系は活性化されたが、エナラプリルによりそれは効果的に抑制されなかった。アゾセミド群ではRAA系の活性化が最小限である傾向が得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the effects of various medication used for heart failure on autonomic tone and renin-angiotensin aldosterone system (RAAS) in dogs with chronic valvular heart disease. Five dogs with experimentally induced mitral regurgitation were used. Furosemide, furosemide and pimobendan, combination of furosemide, pimobendan and enaralril, azosemide and placebo were administered in the cross-over design. Variables of heart rate variability were not significantly different among groups. Urine aldosterone creatinine ratio was increased due to furosemide, however, concurrent administration of enalapril did not seem to suppress RAAS activation. Azosemide appeared minimally influence to RAAS.

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学　臨床獣医学

キーワード： 心拍変動　慢性変性性房室弁疾患　内科治療　犬

１．研究開始当初の背景

利尿薬は前負荷除去薬として、心不全治療において必要不可欠である。近年実施された犬の慢性僧帽弁疾患（MR）に対するピモベンダンの有効性を示した臨床研究を始め、多くの臨床試験で心不全治療薬を検討する場合は利尿剤が併用されている。しかし、ヒトの大規模試験のサブ解析からは、利尿剤の使用量が多いと予後不良であり、それは心機能を示す他のパラメターとは独立しているとされている。これは、利尿剤がレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（RAAS）および交感神経系といった代償機構を活性化させることにより予後に悪影響を及ぼしていると考えられ、基礎研究においてもそれが示されている。

心不全治療薬に使用されるループ利尿薬中でもフロセミドは最もよく使用されているが、短時間作用型のため RAAS および交感神経系を活性化させてしまう可能性が指摘されている。このためフロセミド投薬時にはアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬の併用が推奨されている。しかし ACE 阻害薬を投与していても RAAS が完全にブロックされず、この現象は Aldosterone breakthrough として知られている。そこで、フロセミド投与時は ACE 阻害薬と組み合わせてアルドステロン拮抗薬やアンジオテンシン II 受容体ブロッカー（ARB）を併用あるいは単独使用することが好ましいと考えられるが、犬の心不全においてどの薬剤の組み合わせが、最も効果的に利尿剤による好ましくない代償機構の活性化を抑制することができるのか不明である。

以前我々の研究グループは実験的に MR モデル犬を作成し、心拍変動（HRV）解析による自律神経機能の評価を行い、症状がまだ発現していない早期の段階においても正常犬と比較して HRV に変化が認められたことを報告した。[1] そこで今回我々は同モデル犬を用い、フロセミド投与による交感神経系の活性化が、どの薬剤により効果的に抑制されかつ心機能を維持できるのかを検討することとした。すなわち、フロセミド投与中の心疾患犬において、ACE 阻害薬であるエナラプリル、ARB であるカンデサルタン、アルドステロン拮抗薬であるスピロノラクトンおよびβブロッカーであるカルベジロール等が HRV に及ぼす影響を検討することとした。また、最近の研究から、フロセミドと同等の利尿作用を有しかつ長時間作用型であるアゾセミドによる代償機構の活性化は、短時間作用型のフロセミドよりも緩徐であるとされていることから、アゾセミド単独投与とも比較することとした。

２．研究の目的

本研究の目的は、犬の心不全においてフロセミド投与による交感神経系の活性化が、どの併用薬に最も効果的に抑制されかつ心機能を維持できるのかを自律神経機能の観点から評価することである。

３．研究の方法

（１）MR モデル犬の作成

本研究には、外科的に MR を作成し自然発症例と同等に慢性経過した MR モデルビーグル犬、５頭を用いる予定としていたが、うち 2 頭が全身性疾患に罹患し実験モデル犬として不適切となったため、新たに外科的に MR を作成した。臨床上健康で心疾患の認められない 4 歳の雄のビーグル犬、5 頭(12-14kg)を実験に供試した。MR モデル犬作成方法は、文献 1 に示す通りである。術後 6 ヵ月以上の慢性経過をした犬を本実験の MR モデル犬として使用した。

（２）実験方法

①飼育環境

MR モデル犬の飼育は個別ケージで飼育し、照明の点灯時間および室温を一定とし、飼育のための飼育室への人の出入りも朝夕

一定時刻とした。食餌は同じものを与え、自由飲水とした。

②測定項目

ホルター専用ジャケットに供試犬を馴致させ、その後ホルター心電計を投薬最終 3 日間装着し、心拍変動解析を行った。5 分間のデータごとに対し、ショートタイム高速フーリエ変換（ST-FFT）により各スペクトルを算出した。各スペクトルは、低周波数成分（Low Frequency、LF：0.04～0.15Hz、高周波数成分（High Frequency、HF）：0.15～0.40Hz として解析を行った。それらを1時間ごとに平均値を算出し、計測値とした。したがって測定項目は、HF、LF および簡易的な交感神経指標とされる LF/HF とした。また、心拍数（HR）および連続 100 心拍における RR 間隔平均値に対する RR 間隔平均値の標準偏差の比率（Coefficient of Variance、CVRR）も解析した。

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の指標として、Gardner らの論文をと同様の方法にて、[2]尿中アルドステロン・クレアチニン比（UAC）の測定を行った。

③投薬群の設定

以下に示す治療薬を個体ごとに無作為割り付けし、クロスオーバーさせた。各治療薬群から次の治療薬群の間の休薬（ウォッシュアウト）期間は 2 週間に加えホルター計測 3 日間の計 17 日間とした。なお全ての投薬は経口投与とし、投薬時間は朝 8 時および夜 19 時とした。各薬剤は全て錠剤を用い、体重に合わせて粉末状にはせず、錠剤の分割は最小でも 1/4 錠までとし、各薬剤の体重当たりの設定用量に最も近い投与量を選択した。体重測定は週１回行い、0.5kg 以上の変化が認められた場合は投与量の調整を行った。なお、MR 作成前にも各計測値の記録も行った（コントロール群）。

実験１（１ターム目）

研究当初の背景に記載した通り、本研究では ACE 阻害薬および ARB の心拍変動に及ぼす影響を検討する予定であったが、上述した如く使用予定であった慢性 MR モデル犬が使用不可となり新しくモデル犬を作成し、さらに慢性化する期間を設けたことから試験期間が当初の予定よりかなり短縮・制限されることとなった。そこで ACE 阻害薬および ARB の投与群の設置は見送り、以下の投薬群の検討を行った。

１群：プラセボ群

2 群：フロセミド群（ラシックス錠、2mg/kg,1 日 2 回）＋ピモベンダン（ベトメディン錠、0.3mg/kg，1 日 2 回）

3 群：フロセミド（2 群と同量）＋ピモベンダン（2 群と同量）＋エナラプリル（エナカルド錠、0.5mg/kg,1 日 2 回）

実験２（２ターム目）

１群：プラセボ群

２群：フロセミド群

３群：アゾセミド群（ダイアート錠、5mg/kg，１日１回朝）

④統計方法

実験１および 2 において、心拍変動の各測定値の 4 群間の比較には、対応のある二元配置分散分析法を用いた。UAC については、対応のある一元配置分散分析法を用いてコントロール群以外の 3 群間の比較を行った。さらに実験 2 では、フロセミド群とアゾセミド群の投与前後の比較には対応のある t 検定にて行った。各群の測定値の差に対する有意差検定を行い、危険率は 5%未満をもって有意とした。各群の測定値の表記は、平均値±標準偏差とした。

４．研究成果

（１）実験１の成績

①MR モデル犬の心機能の評価

今回供試した投薬前の MR モデル犬は、ACVIM 分類における B2 が 3 頭(No.1,2,3)、B1 が 2 頭（No.4,5）であった。B1 の 2 頭（No.4,5）は、心拡大が顕著には認められ

ないものの、僧帽弁早期流入速（E 波）はそれぞれ0.97，1.0m/sと増高する傾向が認められた。

②心拍変動解析項目

HR、HF、LF、LF/HF および CVRR の各測定項目を群間で比較したが、いずれの指標においても各群間に有意な差は認められなかった（Fig.1，2）。

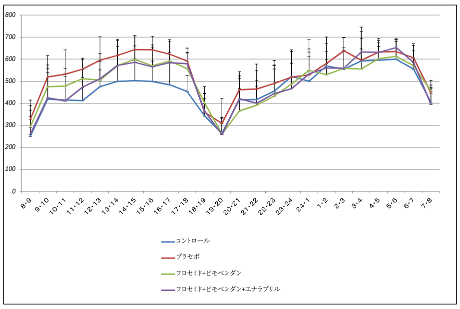

Fig.1　HF (msec²)

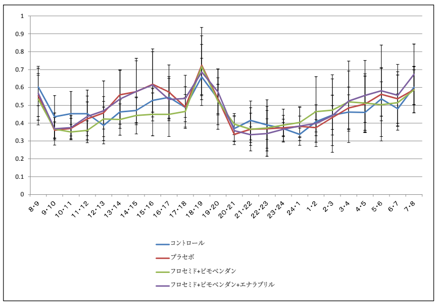

Fig.2　LF/HF

③UAC

UAC のプラセボ群、フロセミド+ピモベンダン群、フロセミド+ピモベンダン+エナラプリル群の測定値はそれぞれ 0.9±0.1μg/g、3.4±0.7μg/g、3.5±0.6μg/g であり、プラセボ群と比較し２つの投薬群では UAC は有意に増加した。しかしフロセミド＋ピモベンダン群とフロセミド＋ピモベンダン＋エナラプリル群の間に有意な差は認められなかった（Fig.3）。

（２）実験１の小括

フロセミドをピモベンダンと併用した場合も、フロセミドをピモベンダンならびにエナラプリルと併用した場合も、心拍変動解析上交感神経活性の亢進等、自律神経に及ぼす影響は今回の実験では検出されなかった。一方、UAC による RAAS の活性化については、フロセミド+ピモベンダン併用群およびフロセミド+ピモベンダン+エナラプリル併用群では RAAS の活性化が認められたが、2 群間に有意差は認められなかったことから、フロセミドによる RAAS の活性化は、エナラプリルの併用によって緩和されなかった。

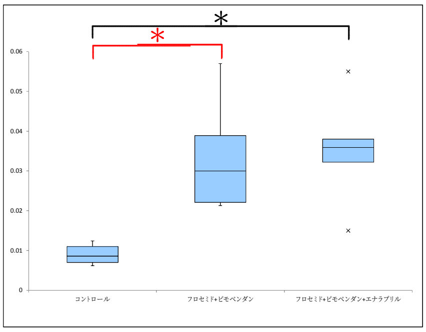

Fig.3　UAC

（３）実験２の成績

①MR モデル犬の心機能の評価

実験１と同様投薬前の MR モデル犬は、ACVIM 分類における B2 が 3 頭(No.1,2,3)、B1 が 2 頭（No.4,5）であった。

②心拍変動解析項目

HR、HF、LF、LF/HF および CVRR の各測定項目を群間で比較したが、いずれの指標においても各群間に有意な差は認められなかった（Fig.4,5）。

③UAC

UAC は、プラセボ群で 0.9±0.1μg/g、フロセミド群で 2.2±0.5μg/g、アゾセミド群で 1.4±0.3μg/g であった。フロセミドで最も高値を示す傾向はあるものの、各群の平均値の間に有意な差は認められなかった。しかし、個々の個体における投薬前後の変化をみると、フロセミドおよびアゾセミド投薬後に UAC は増大する傾向が認められ、特にフロセミドでは全個体で投与前と比較し投与後に上昇した（Fig.6）。

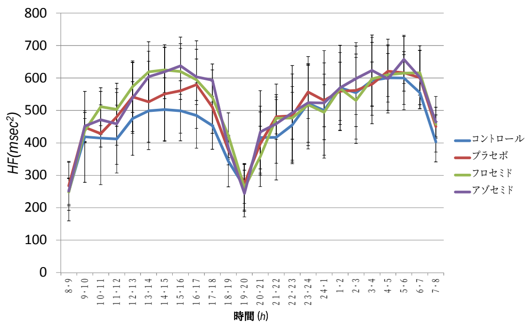

Fig.4 HF (msec^2)

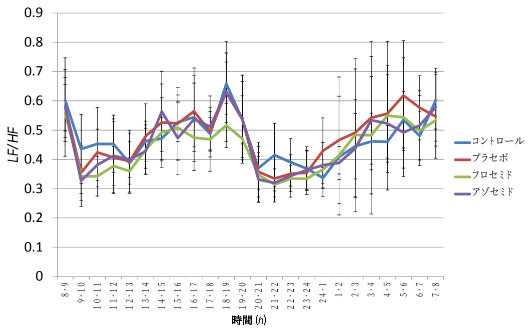

Fig.5 LF/HF

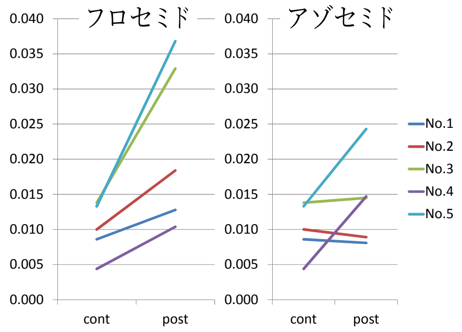

Fig.6 UAC

さらに、実験１および２の全群を比較したところ､アゾセミド群とフロセミド+ピモベンダン群およびアゾセミド群とフロセミド+ピモベンダン+エナラプリル群の間に有意な差が認められた（Fig.7)。

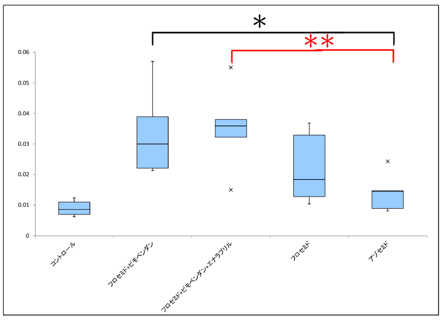

Fig.7 UAC 全群比較

（４）実験２の小括

フロセミド群およびアゾセミド群両群とも、心拍変動解析上交感神経活性の亢進等、自律神経に及ぼす影響は今回の実験では検出されなかった。UAC についても、プラセボ群と比較し両群に有意な差は認められなかった。しかしフロセミド投与群において全頭で投与後の UAC の上昇が認められた。さらに実験１の結果と併せて検討したところ､アゾセミド群とフロセミド+ピモベンダン群間、また、アゾセミド投与群とフロセミド+ピモベンダン+エナラプリル群間において有意差が認められた。よって、フロセミドの単独使用やフロセミドをピモベンダンならびにエナプリルと併用するよりも､アゾセミドを使用したほうが RAAS の活性化への影響が少ない可能性があると考えられた。

（５）総括

ヒトのうっ血性心不全患者において、フロセミド投与により交感神経系の活性化が認められるとされているが、本研究の結果では心拍変動解析のいずれの項目も４群間に有意差は認められなかった。また実験２においても、フロセミドおよびアゾセミドを投与した場合の心拍変動の指標は、各群間で有意差は認められなかった。その原因として、１）今回のフロセミド投与量では軽度 MR 犬の自律神経機能に大きく影響しない、あるいは本検査法の検出限界以下であった､あるいは２）サンプル数の少なさ、犬の飼育環境整備の不十分さなどから自律神経機能に及ぼす影響が適切に評価されなかった、が考えられた。また、近年臨床で房室弁疾患に罹患した犬に対しループ利尿薬を使う時期は、ACVIM 分類ステージ C 以降のうっ血性心不全時である。本研究で用いた ISACHC クラス I の MR 犬に対してフロセミドを投薬することは臨床ではほとんどない。そのため、今後は MR 重症度

の高い犬について検討する必要があると考えられた。

第１実験において、フロセミド+ピモベンダン群、フロセミド+ピモベンダン+エナラプリル群ともにUACの明らかな増加が認められたが、2 群間に有意差は認められなかった。したがって、仮説とは異なりフロセミドによって生じたRAASの活性化は、エナラプリルの併用によって緩和されなかった。

実験１および実験２のUACの比較を行ったところ、アゾセミド群とフロセミド+ピモベンダン群、およびアゾセミド群とフロセミド+ピモベンダン+エナラプリル群の間に有意差が認められ、フロセミドの単独使用やフロセミドとピモベンダンならびにエナプリルを併用するよりも、アゾセミドを使用したほうが、RAASへの影響は少ないと考えられた。フロセミドは短時間作用型利尿薬であることから、一過性で急激な利尿により血圧の低下が生じやすく、それにより代償機構である交感神経系およびRAASの活性化が生じやすいと考えられる。一方アゾセミドは長時間作用型であるため、利尿作用は緩慢であることから血圧の低下も緩徐であると考えられ、したがって代償機構の活性化はフロセミドほど生じなかったと考えられた。以上のことから、フロセミドよりもアゾセミドのほうがRAASへの影響が少なく、心不全患者の生命予後を改善可能性があると考えられた。

今回の研究で、ACE阻害薬はフロセミドによるRAASの活性化を明らかに緩和することができなかったものの、心不全患者の生命予後を改善することから慢性房室弁疾患の鬱血性心不全を呈するステージにおいては適応である。今後は、ACE阻害薬も様々な種類が存在することから他の種類のACE阻害薬について、またスピロノラクトン、ARBなど今回検討できなかった併用薬の組み合わせについて、今後検討する必要があると考えられた。

参考文献

1. Fujii Y, Wakao Y. Spectral analysis of heart rate variability in dogs with mild mitral regurgitation. Am J Vet Res 2003;64:145-148.
2. Gardner SY, Atkins CE, Rausch WP, et al. Estimation of 24-h aldosterone secretion in the dog using the urine aldosterone:creatinine ratio. J Vet Cardiol 2007;9:1-7.

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計１件）

① 藤井洋子、JCVIM（日本獣医内科学アカデミー）、2014年2月、横浜開催、「心機能と心外臓器の関わり」、教育講演の中で発表。

６．研究組織

(1)研究代表者

藤井洋子（FUJII，Yoko）
麻布大学・獣医学部獣医学科・教授
研究者番号：10318884