

犬における  
心不全が及ぼす脾臓血流変化に関する研究

2020 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(東京農工大学)

吉村有正

犬における

心不全が及ぼす脾臓血流変化に関する研究

吉村有正

# 目次

## 序論

1. 緒言 .....	2-4
-------------	-----

## 第 1 章 高頻度心室刺激犬の作製と心機能の評価

1. 緒言 .....	6-7
2. 方法 .....	
2-1. ガイドラインの遵守 .....	8
2-2. 供試動物 .....	8
2-3. 実験犬の作出 .....	8-9
2-4. 実験プロトコール .....	
2-4.1 心臓超音波検査 .....	10-11
2-4.2 血圧測定 .....	11-12
2-5. 統計手法 .....	12
3. 結果 .....	
3-1. 心臓超音波検査 .....	13
3-2. 血圧測定 .....	13
4. 考察 .....	14-17
5. 小括 .....	18
6. 図表 .....	19-31

## 第 2 章

### 高頻度心室刺激犬の脾臓の血流量ならびに形態的变化の評価

1. 緒言 .....	33-34
2. 方法	
(a) 心機能と脾臓血流量の評価	
2(a)-1. ガイドラインの遵守 .....	35
2(a)-2. 供試動物 .....	35
2(a)-3. 実験犬の作出 .....	35
2(a)-4. 実験プロトコール	
2(a)-4.1 心臓超音波検査 .....	35-36
2(a)-4.2 血圧測定 .....	36
2(a)-4.3 造影超音波検査 .....	36-37
2(a)-5 統計手法 .....	38
(b) 脾臓組織の病理組織学的評価	
2(b)-1. ガイドラインの遵守 .....	39
2(b)-2. 供試動物 .....	39
2(b)-3. 実験プロトコール	
2(b)-3.1 脾臓組織のサンプリング .....	39-40
2(b)-3.2 病理組織学的検査 .....	40
2(b)-3.3 免疫組織化学検査 .....	40-41
2(b)-3.4 血液化学的検査 .....	41
2(b)-4 統計手法 .....	41
3. 結果	
(a) 心機能と脾臓血流量の評価	



3(a)-1. 心臓超音波検査 .....	42
3(a)-2. 血圧測定 .....	42
3(a)-3. 造影超音波検査 .....	42
(b) 脾臓組織の病理組織学的評価	
3(b)-1. 病理組織学的検査 .....	43
3(b)-2. 免疫組織化学検査 .....	43
3(b)-3. 血液化学的検査 .....	43
4. 考察 .....	44-48
5. 小括 .....	49
6. 図表 .....	50-68

## 第 3 章

### 心機能改善薬投与による高頻度心室刺激犬の腓臓の血流量 ならびに形態的变化の評価

1. 緒言 .....	70-71
2. 方法 .....	
2-1. ガイドラインの遵守 .....	72
2-2. 供試動物 .....	72
2-3. 実験犬の作出 .....	72
2-4. 実験プロトコール .....	
2-4.1 心臓超音波検査 .....	73
2-4.2 血圧測定 .....	73
2-4.3 造影超音波検査 .....	73-74
2-4.4 腓臓組織のサンプリング .....	74
2-4.5 病理組織学的検査 .....	74
2-4.6 免疫組織化学検査 .....	74-75
2-5. 統計手法 .....	75
3. 結果 .....	
3-1. 心臓超音波検査 .....	76
3-2. 血圧測定 .....	76-77
3-3. 造影超音波検査 .....	77
3-4. 病理組織学的検査 .....	77-78
3-5. 免疫組織化学検査 .....	78
4. 考察 .....	79-81
5. 小括 .....	82
6. 図表 .....	83-96

総括 ..... 97-101

謝辞 ..... 102

引用文献 ..... 103-119

## 略語表

本論文中では、以下の略語を使用する。

AUC	曲線下面積
BSA	体表面積
CI	心係数
CO	心拍出量
cPLI	犬腭特異的リパーゼ免疫活性
CVP	後大静脈圧
DBP	拡張期血圧
DCM	拡張型心筋症
ET	駆出時間
FS	左心室内径短縮率
HE	ヘマトキシリン・エオジン
HR	心拍数
LA/Ao	左心房－大動脈径比
LVIDd	拡張末期左心室内径
LVIDs	収縮末期左心室内径
MB	マイクロバブル
MBP	平均血圧
MMVD	粘液腫様変性性僧帽弁閉鎖不全症
PDE	ホスホジエステラーゼ
PEP	前駆出時間
PEP/ET	前駆出時間－駆出時間比
PI	最高輝度増加率

ROI	関心領域
RVP	高頻度心室刺激
SBP	収縮期血圧
SV	左心室 1 回拍出量
SVR	体血管抵抗
TIC	輝度増加率－時間曲線
TP	ピーク到達時間
TTU	初期上昇時間
TTW	ウォッシュアウト時間
VTI	血流速度時間積分値

## 序論

## 1. 緒言

心臓は、律動的な拡張/収縮を絶え間なく繰り返すことにより全身へと血液を駆出するというポンプ機能を有した、生命維持に必要不可欠な臓器である[1]。規則的な心臓内の電気伝導により心房と心室が順序良く連続して収縮すること、心腔内の弁により血液が一方向性に流れること、そしてなにより、心室が十分に拡張/収縮することにより、心臓は効率よく血液を駆出することが可能となる[2]。特に左心室は、肺を除く全ての全身組織へと血液を送り出す役割を担うことから、高い収縮機能を維持し続けることが必要とされている[3]。そのため、心筋症や頻脈性不整脈といった疾患により左心室の収縮機能が障害されると、心臓内、さらには全身の血行動態が著しく悪化し、心不全病態へと陥ることになる[4-6]。心不全とは、心ポンプ機能が破綻した結果、全身組織が必要とするだけの心拍出量（cardiac output; CO）が維持できなくなり、組織の灌流不全をきたした病態と定義されている[7]。そのため、組織灌流量を維持するためには、COを確保することが最も重要となる。そしてCOが低下した結果、末梢組織に十分な酸素・栄養を供給することが困難となり、腎臓、肝臓、消化管といった腹部臓器に対し虚血/低灌流に基づく様々な障害を引き起こすことになる[8-10]。

腹部臓器のなかでも膵臓は、虚血/低灌流に対し脆弱な臓器であると考えられている[11]。近年、僧帽弁閉鎖不全症により心不全に陥った犬において、膵腺房細胞傷害を有する個体の比率が有意に上昇するという報告がなされ、心不全と膵腺房細胞傷害の間に関連性があることが示唆された[12]。この報告では、心不全によりCOが低下し、膵臓が低灌流にさらされた結果、膵腺房細胞傷害が引き起こされたのではないかと推測されている[12]。しかしながら、この研究内では実際にCOや膵臓血流量は測定されておらず、心不全と膵腺房細胞傷害の関連性を解明するには不十分なものであった。これ

までに犬において、心ポンプ機能の低下により腓臓血流量がどのように変化するのか検討した報告は認められない。さらに、これらの犬において、実際に腓臓組織にどのような影響が及ぼされるかについても不明なままである。

腓腺房細胞傷害は、腓臓の広範囲な炎症、さらには壊死を引き起こしうる重要な要因の一つとされている[13]。そのため、COの低下が腓腺房細胞に直接的影響を与えるか否かは、心不全犬の治療戦略として、重要な検討事項であると考えられる。

以上のことから、本研究は、低拍出性心不全を惹起するとされる高頻度心室刺激犬[14,15]を作製し、COの低下が腓臓に与える影響を明確にすることを目的とし、以下の構成で研究を進めた。

## 第1章 高頻度心室刺激犬の作製と心機能の評価

心室に高頻度の電気刺激を与えることにより低拍出性心不全病態を惹起するとされる高頻度心室刺激犬を作出し、それらに対し心臓超音波検査や血圧測定を行った。そして、心不全時における臓器血流量の変化を検討するにあたり、RVP犬が適切なモデルであるか否かを評価した。

## 第2章 高頻度心室刺激犬の腓臓の血流量ならびに形態的变化の評価

第1章において、本研究を進めるにあたり低拍出性心不全モデルとして適切であると判断された高頻度心室刺激犬の腓臓血流量を測定することにより、CO低下時において腓臓血流量がどのように変化するのかを明確にすることを目的とした。さらに、腓臓に対し病理組織学的検査を行うことにより、COの低下が腓臓組織にどのような影響を与えるのかを検討した。

## 第3章 心機能改善薬投与による高頻度心室刺激犬の腓臓の血流量ならびに形態的变化の評価



第 2 章において、CO の低下は、腓臓血流量の低下を引き起こし、さらにその結果、腓腺房細胞を萎縮させることが明らかとなった。それを受けて、第 3 章では、高頻度心室刺激犬に心機能改善薬投与であるピモベンダンを投与した。そして、CO の低下が軽減された際の腓臓の血流量の変化ならびに腓腺房細胞の病理組織学的変化を評価することにより、腓臓血流量および腓腺房細胞の形態的变化の関連性をより明確にすることを目的とした。

## 第 1 章

### 高頻度心室刺激犬の作製と心機能の評価

## 1. 緒言

心不全とは、何らかの心疾患により心ポンプ機能が不全に陥った結果、心臓から十分な動脈血を拍出することが困難となり CO の低下に起因した様々な臨床徴候が出現した病態と定義されている [7,16]。特に、CO の低下が重度となると、腎臓や肝臓、および消化管といった腹部諸臓器に対し、虚血/低灌流に基づく様々な障害を引き起こすことになる [8-10]。

獣医療において、犬の心不全は依然として死因の上位を占める重要な病態であり [17,18]、その病態の解明のため、古くから多くの研究がなされてきた [19-26]。しかしながら、その研究のほとんどは、心不全時における心機能あるいは心臓内血行動態変化の解明を目的としており [19-25]、臓器灌流量の変化ならびに腹部諸臓器に対する低灌流性障害については、十分な検討がなされていなかった。

臓器灌流量を維持する上で最も重要な因子として、臓器への血流を生み出す実質的な原動力である動脈血圧が挙げられる [27]。動脈血圧は、心臓から拍出された血液が血管壁を押す圧力である [27]。このことから、心不全時における動脈圧の変化は、CO の影響を大きく受けることになる [27]。そのため、心不全時における臓器血流量の変化を検討するには、CO が低下し、さらに動脈血圧が低下するような心不全モデルを作出する必要があると考えられる。

生体の生理的变化として、運動時や心理的緊張時など全身の酸素要求量が増加する場合には、心拍数 (heart rate; HR) の増加に伴い CO は増加する [28]。しかしながら、持続的かつ長期にわたる HR の増加は、心室拡張時間の短縮から左心室 1 回拍出量 (stroke volume; SV) を減少させ、逆に CO の低下を引き起こすことが知られている [29]。これまでに、心室に高頻度の電気刺激 (rapid ventricular pacing; RVP) を与えることにより頻脈状態を惹起

させる低拍出性心不全モデルが考案されている[14,15]。

本章では、高頻度心室刺激犬（RVP 犬）を作出し、それらに対し心臓超音波検査や血圧測定を行った。そして、心不全時における臓器血流量の変化を検討するにあたり、低拍出性心不全モデルとして適切であるかを評価した。

## 2. 方法

### 2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規程に準拠し遂行した。(承認番号：第31-2)

### 2-2. 供試動物

本研究に先立ち、身体検査、心臓超音波検査、完全血球検査、血液化学検査および心電図検査を行い、全身状態に問題がないと判断した実験用ビーグル 5 頭を供試した。性別は雄 2 頭、雌 3 頭、年齢は 2 ～ 4 歳、体重は 9.4 ～ 14.0 kg (中央値: 12.0 kg) であった。食事は成犬用健康維持食 (Vet's selection: イースター株式会社, 兵庫, 日本) を 1 日あたり  $1.8 \times (70 \times [\text{kg body weight}]^{0.75}) \text{ Kcal}$  となるように給餌し [30]、飲水は自由飲水とした。実験用ビーグル犬の飼育環境は、室温を  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ 、湿度を  $50 \pm 20\%$  に調整した。飼育環境にて、ステンレス製の実験ケージに個別にて飼育した。また、照明は 12 時間後毎に明/暗に切り替わるよう設定した。

### 2-3. 実験犬の作出

前述のビーグル犬 5 頭に全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを設置した。麻酔前投与として、ミダゾラム (ドルミカム, アステラス製薬, 東京, 日本) 0.2 mg/kg の静脈内投与を実施した。麻酔導入をプロポフォール (プロポフォール, フレゼニウスカービ, 東京, 日本) 6 ～ 8 mg/kg (to effect) 静脈内投与により行い、気管チューブを気管内挿管後にイソフルラン (イソフル, DS ファーマアニマルヘルス, 大阪, 日本) により麻酔維持 (呼気終末イソフルラン濃度: 1.5 – 2.0%) を行なった。右側第 6 肋間にて開胸し、右心室心外膜に心室刺激電極リード (TY216-033, ユニークメディカル, 東京, 日

本)を縫着した (Fig.1-1.)。心室刺激電極リードは、皮下を通して体外に露出させ、常法に従い閉胸を行なった。周術期の疼痛管理として、術前にブブレノルフィン 0.02 mg/kg (レペタン, 大塚製薬, 徳島, 日本)を静脈内投与した。さらに、切皮前ならびに閉創後には、ブビパカイン塩酸塩水和物 0.5% (マーカイン, アスペンジャパン, 東京, 日本) 2 mg/kg ならびにリドカイン 2% (キシロカイン, アスペンジャパン, 東京, 日本) 2 mg/kg を切開創に沿って局所投与した。手術後は、ロベナコキシブ (オンシオール, エランコジャパン, 東京, 日本) 2 mg/kg を SID にて手術当日ならびに術後 3 日間皮下投与した。また、感染予防として、アンピシリンナトリウム (ビクシリン, 明治製菓ファルマ, 東京, 日本) 25 mg/kg を BID にて手術当日ならびに術後 7 日間、静脈内投与した。術後養生期間として、14 日間設け、体外式ペースメーカー (EV4543, 大正医科器械, 東京, 日本) を付帯させたジャケットを装着し、心室刺激電極リードと体外式ペースメーカーを接続した後、RVP を開始した (Fig.1-2.) (Fig.1-3.)。RVP の設定は、4V、260 回/分、4 週間とした。心室ペーシングの頻度は、心電図 (D300, フクダ ME 工業, 東京, 日本) を用いて設定した。また、実験期間を通して、ペーシングが正確に行われているか否かを、心電図装置を用いて毎日確認した。

#### 2-4. 実験プロトコール

RVP の開始前 (Baseline)、4 週間目 (4 W) を測定ピリオドとして、以下の各種検査を実施した (Fig.1-4.)。各種検査は、12 時間以上の絶食状態 (自由飲水) ならびに塩酸ブトルファノール (ベトルファール, 明治製菓ファルマ, 東京, 日本) 0.2 mg/kg の静脈内注射による鎮静状態において、同一日に連続して行なった。また、各測定ピリオドにおいて、同じ手順かつ同じ時間帯に行なった (午後 5-6 時)。また、動物の興奮による検査値の影響を避けるため、そして心臓の血行動態を十分に把握するため、Fukushima らの報告

と同様に、各種検査は RVP を一時停止させた 30 分後に実施した[31]。

#### 2-4.1 心臓超音波検査

心臓超音波検査には、超音波診断装置（Vivid E 95, GE ヘルスケアジャパン, 東京, 日本）ならびに 4.0-8.0 MHz のセクタ型プローブ（7S, GE ヘルスケアジャパン, 東京, 日本）を用いた。また、超音波検査の画面上に心電図を同期させた。

右傍胸骨左室短軸断面像心基部レベルの B モードにおいて、左心房径と大動脈径の比（left atrial to aortic ratio; LA/Ao）を計測した（Fig.1-5.）。

右傍胸骨左室短軸断面像腱索レベルの M モードにおいて、拡張末期左心室内径（left ventricular end-diastolic dimension; LVIDd）、収縮末期左心室内径（left ventricular end-systolic dimension; LVIDs）、および左心室内径短縮率（fractional shortening; FS）を計測した（Fig.1-6.）。なお FS は、以下の式により算出した[32]。

$$FS (\%) = \{(LVIDd - LVIDs) / LVIDd\} \times 100$$

左傍胸骨心尖部五腔断面により大動脈弁口部を描出し、ドプラモードを用いて大動脈弁口部波形から SV、CO ならびに左心室における前駆出時間（pre ejection period; PEP）と駆出時間（ejection time; ET）の比（pre ejection period to ejection time ratio; PEP/ET）を計測した（Fig.1-7.）。

その際のサンプルボリュームの位置は、大動脈弁ならびに肺動脈弁の閉鎖部に設定した。各 PEP は心電図の Q 波から各心室駆出までの区間と設定した[33,34]。SV と CO は、以下の式により算出した[33,35]。

$$SV (ml) = (d/2)^2 \times \pi \times VTI$$

$$CO \text{ (l/min)} = SV \times HR$$

d: 大動脈弁部径あるいは肺動脈弁部径,

VTI: 血流速度時間積分値 (velocity time integral)

また、CO に対する個体間の体格差の影響を是正するため、体表面積 (body surface area; BSA) から心係数 (cardiac index; CI) を以下の式により算出した [36,37]。

$$BSA \text{ (m}^2\text{)} = 10.1 \times (\text{g body weight})^{2/3} \times 10^{-4}$$

$$CI \text{ (l} \times \text{min}^{-1} \times \text{m}^{-2}\text{)} = CO/BSA$$

測定者間誤差を考慮し、同一の測定者が検査を行なった。また、心臓超音波検査データは、連続する 9 拍の平均値を測定値とした。

#### 2-4.2 血圧測定

収縮期血圧 (systolic blood pressure; SBP), 平均血圧 (mean blood pressure; MBP) および拡張期血圧 (diastolic blood pressure; DBP) は、オシロメトリック法を測定原理とした動物用血圧測定器 (BP-100D, フクダ ME 工業, 東京, 日本) を使用し、測定した。測定部位は尾根部とし、測定部位周囲長の 40-60% のカフを用いた。一回の測定毎に計測を 3 回以上繰り返し、得られた値の差が 3 mmHg 以内である場合に、3 回の平均値を測定値として採用した。

これまでに、本研究に使用したものと同様の RVP 犬において、後大静脈圧 (central venous pressure; CVP) が概ね 10 mmHg まで上昇することが知られている [38]。そのため、Baseline において CVP を 5 mmHg [39]、4W において 5 mmHg、10 mmHg、あるいは 15 mmHg と仮定し、以下の式を用いて



それぞれの場合の体血管抵抗（systemic vascular resistance; SVR）を算出した[40]。

$$\text{SVR (dyne} \times \text{sec} \times \text{cm}^{-5}) = (\text{MBP-CVP}) / \text{CO} \times 79.92$$

## 2-5. 統計手法

得られた各測定値が正規分布しているか否かを Shapiro-Wilk test により評価した。全てのデータは平均値±標準偏差として示した。そして、これらデータに関して、Paired t-test を使用して Baseline ならびに 4W における比較を行なった。統計解析はパソコン用ソフトウェア（BellCurve for Excel, 株式会社社会情報サービス, 東京, 日本）を用いて行い、いずれの検定も  $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

### 3. 結果

実験犬 1、2 ともに、4 週間にわたる研究期間を通して RVP による食欲不振、発咳、消化器症状および呼吸困難などの臨床徴候は、認められなかった。

#### 3-1. 心臓超音波検査

B モードにおいて、LA/Ao は Baseline と比較し 4W において増加した ( $p<0.01$ ) (Table.1-1.)。

M モードにおいて、LVIDd ならびに LVIDs は Baseline と比較し 4W において増加した (いずれも  $p<0.01$ )。さらに、LVIDs の増加率は LVIDd のそれを上回るものであった。FS は 4W において低下した (いずれも  $p<0.01$ ) (Fig.1-8.) (Table.1-1.)。

ドプラモードにおいて、PEP/ET は Baseline と比較し 4W において増加した ( $p<0.01$ )。SV、CO および CI は 4W において低下した (いずれも  $p<0.01$ ) (Fig.1-9.)。

HR は 4W において増加した ( $p<0.01$ ) (Table.1-1.)。

#### 3-2. 血圧測定

SBP、MBP および DBP は、Baseline と比較し 4W において低下した (いずれも  $p<0.01$ ) (Fig.1-10.) (Table.1-2.)。

SVR は、CVP 値を Baseline において 5 mmHg、4W において 5 mmHg、10 mmHg あるいは 15 mmHg と仮定した場合、いずれの組み合わせにおいても、Baseline と比較して、4W において有意差は認められなかった (Table.1-3.)。

#### 4. 考察

本章では、健常ビーグル犬の右心室に対して、持続的なRVPを与えると  
いう手法を用いることで、低拍出性心不全モデル犬の作製を試みた。

心臓超音波検査を用いた心機能の評価では、Baselineと比較して4Wにおいて、FSの低下が認められた。通常、FSの低下は、前負荷の低下、後負荷の増加あるいは心筋収縮力の低下により引き起こされる[33,41]。今回、前負荷の指標にLVIDd、ならびに後負荷の指標にSVRを用いた。今回、LVIDdは拡大していたことから、前負荷は増大していたと考えられる。SVRに関しては、その値を求める公式内にCVPが含まれるため、CVPの値の影響を受けることになる。これまでに、本研究に用いた手法と同様に作製されたRVP犬において、CVPがRVP開始前の5 mmHgから概ね10 mmHgまで上昇することが明らかにされている[38]。そのため、今回のBaselineのCVPを5 mmHgと仮定し、さらに4WのCVPを5 mmHg、10 mmHgあるいは15 mmHgと設定した。その結果、これら全ての組み合わせにおけるCVP値を代入した際のSVRにおいて、RVP前後でその変化は認められなかった。そのため、後負荷の増大は引き起こされていないものと判断した。また、正常な心臓では、前負荷、すなわちLVIDdが増加する病態においても、フランク・スターリングの法則がはたらくことによりLVIDsはほとんど変化しない[42]。しかしながら、今回、LVIDsの増加率はLVIDdの増加率を大きく上回るものであった。よって、今回RVP犬に認められたFSの低下は、左心室筋収縮力の低下を意味していると考えられた。さらに、PEP/ETの値は、数値が小さいほど左心室筋収縮力の増大を意味し、逆に数値が大きいほどその低下を意味している[34,43]。以上のことから、本章で設定した条件下において、RVPにより左心室収縮機能の低下を惹起できることが示された。

また、本章の研究に供したRVP犬において、SVとCOの低下、ならびに

HR の増加が認められた。FS と同様に、SV の低下は前負荷の低下、後負荷の増加あるいは心筋収縮力の低下により引き起こされる [32,35]。そのため、今回 RVP 犬に認められた SV の低下は、心収縮力の低下に起因するものと考えられた。また、心不全病態では、心臓ポンプ機能の低下に対し、全身循環を維持するため様々な代償機構がはたらくようになる [44-46]。中でも、交感神経活性や副交感神経抑制といった自律神経バランスの変化による代償機構は、洞結節の自動能を亢進することにより HR を増加する。そして、それにより低下した SV を補い、CO の維持に寄与することとなる [46,47]。しかしながら、今回の RVP 犬においては、HR が増加したにも関わらず CO の低下が認められた。これは、HR の増加では CO を維持できないほどに、左心室における心ポンプ機能が低下していることを示唆している。さらに、CO における個体差を体表面積により補正した CI は、健常犬の基準値 ( $3.5-5.5 \text{ l/min/m}^2$ ) を下回っていた [48]。本章の供試動物は、ほとんどの時間帯をケージ内で生活していたため、心不全の臨床症状は明白なものではなかった。しかしながら、この CI の低値は、供試動物が血行動態的には、心不全状態に陥っていたことを示している。

また、洞結節は自律神経の影響だけでなく、物理的な刺激によってもその自動能が亢進することが知られている [49]。Lange らは、洞房結節部組織の進展により、歩調取り電位の脱分極速度の充進ならびに静止電位の減少が引き起こされ、HR が上昇することを報告した [49]。また、これまでに犬において、RVP は心室拡張時間を短縮することにより心房血を鬱滞させ、さらには両心房の拡大を引き起こすことが明らかとなっている [50]。本研究においても、RVP により LA/Ao の増加、すなわち左心房の拡大が認められた。そのため、今回認められた HR の上昇には、心機能低下に対する代償機構に加え、心房拡大という心臓の構造的変化も関与していると考えられた。

非観血的血圧測定では、SBP、MBP および DBP の全ての血圧測定項目値

の低下が認められた。動脈血圧は、すべての臓器への血流を生み出す実質的な原動力であるとされている[27]。そのなかでも MBP は、臓器灌流量を規定する最も重要な因子であると考えられている[27,51]。そのため、今回の RVP 犬において、腹部諸臓器の灌流量は減少している可能性が高いことが示唆される。一方、SVR においては、その低下が認められなかったことから、本研究の供試動物でみられた MBP の低下は、主に CO の低下に起因していると考えられた。このことから、RVP により左心室収縮機能の低下が引き起こされた結果、CO が低下し、さらには MBP の低下が引き起こされたものと判断した。

本研究にはいくつかの制限事項が存在する。第 1 に、本研究で採用した心不全タイプは低拍出性心不全であり、供試動物の血行動態は、臨床的に拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy; DCM) に非常に類似したものであったことである[52]。犬の心疾患うち最も多いものは、僧帽弁の粘液腫様変性による僧帽弁閉鎖不全症 (myxomatous mitral valve disease; MMVD) である。一般的に MMVD は数ヶ月から数年に及ぶ慢性経過をとり、CO が低下するとされるのは病態としてはかなり後期である[53]。そのため、本研究結果を臨床的に遭遇する心不全犬における心機能として、直接的に外挿するには注意を要する。第 2 に、本研究における血圧測定は非観血的測定を採用した点である。そのため、血圧測定のゴールドスタンダードである観血的血圧測定と比較して、リアルタイムかつダイナミックな変動をとらえきれていない可能性がある。最後に本研究に供した動物の数が少ないという問題が挙げられる。

以上のことより、健常ビーグル犬の右心室に対し 4 週間の RVP を施すことにより左心室収縮力が低下した結果、CO ならびに MBP の低下を示すことが明らかとなった。そのため、今回採用した RVP 犬は、心不全と腹部臓器血流量の関係性を評価するのにあたり、適切な心不全モデルであるものと判断

した。

## 5. 小括

本研究において、5頭のRVP犬を作製し、心臓超音波検査を実施したところ、左心室収縮力の低下ならびにCOの低下が認められた。さらに、CIは参考基準値を下回っていたことから、心不全状態に陥っていたものと考えられた。また、血圧測定を実施したところ、COの低下に基づくMBPの低下が認められた。

以上のことから、RVP犬は心不全と腹部臓器血流量の関係性を評価するのにあたり、適切な心不全モデルであるものと判断した。

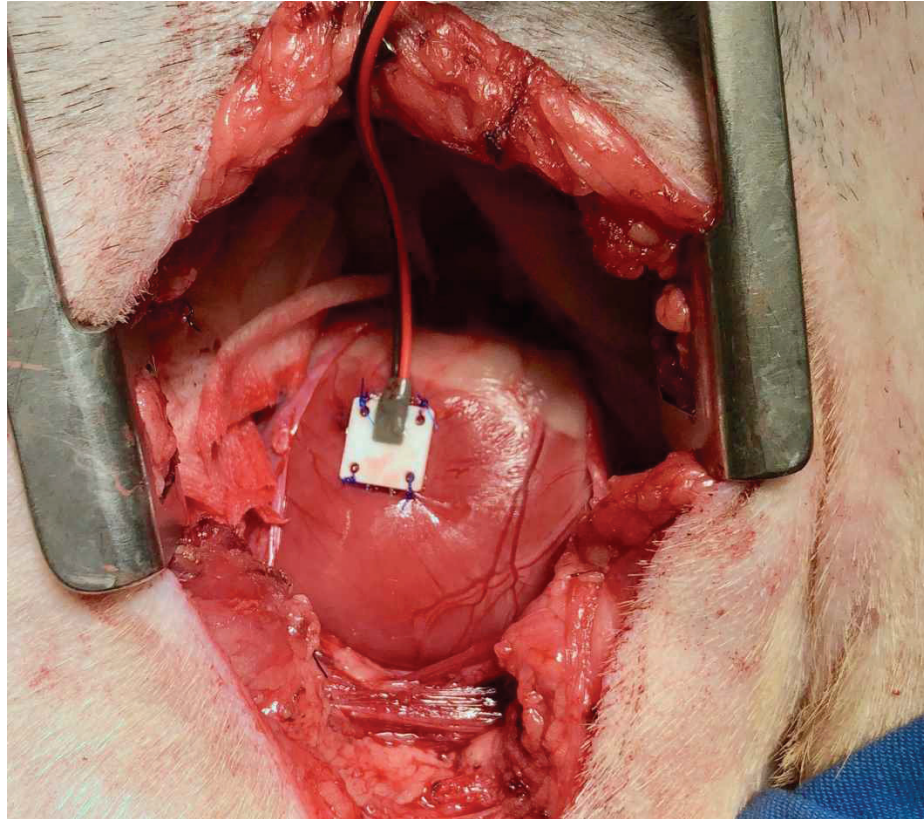


Fig. 1-1. 心室刺激電極リード設置手技

右側第6肋間の開胸により，右心室を露出して，心室刺激電極リード（TY216-033，ユニークディカル，東京，日本）を縫着した。





Fig. 1-2. 体外式ペースメーカー（EV4543, PACE Medical, Inc., USA）  
動物の体外に露出した電極リードと接続し，260 回/分の高頻度で 4 週  
間にわたり右心室を刺激した。



Fig. 1-3. ポケット式ホルタージャケットとその装着  
背面のポケットに体外式ペースメーカーを収納する。ジャケット内の体外式ペースメーカーと供試動物のリードを接続し、高頻度心室刺激が可能となる。

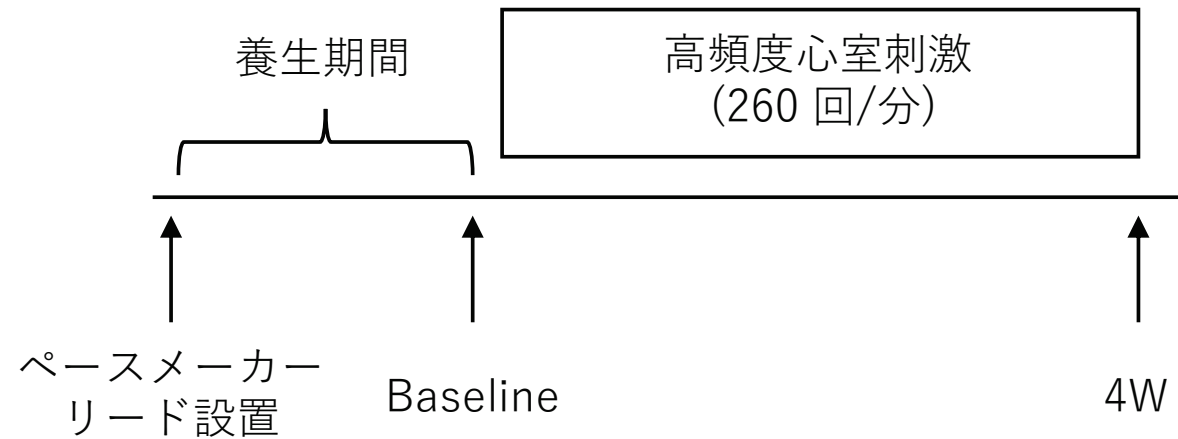


Fig. 1-4. 実験プロトコール

ペースメーカーリードを右心室に縫着した後、術後養生期間として 14 日間設けた。その後、心室刺激前 (Baseline)、刺激開始 4 週間目 (4W) の各測定ピリオドにおいて、心臓超音波検査ならびに血圧測定を実施した。

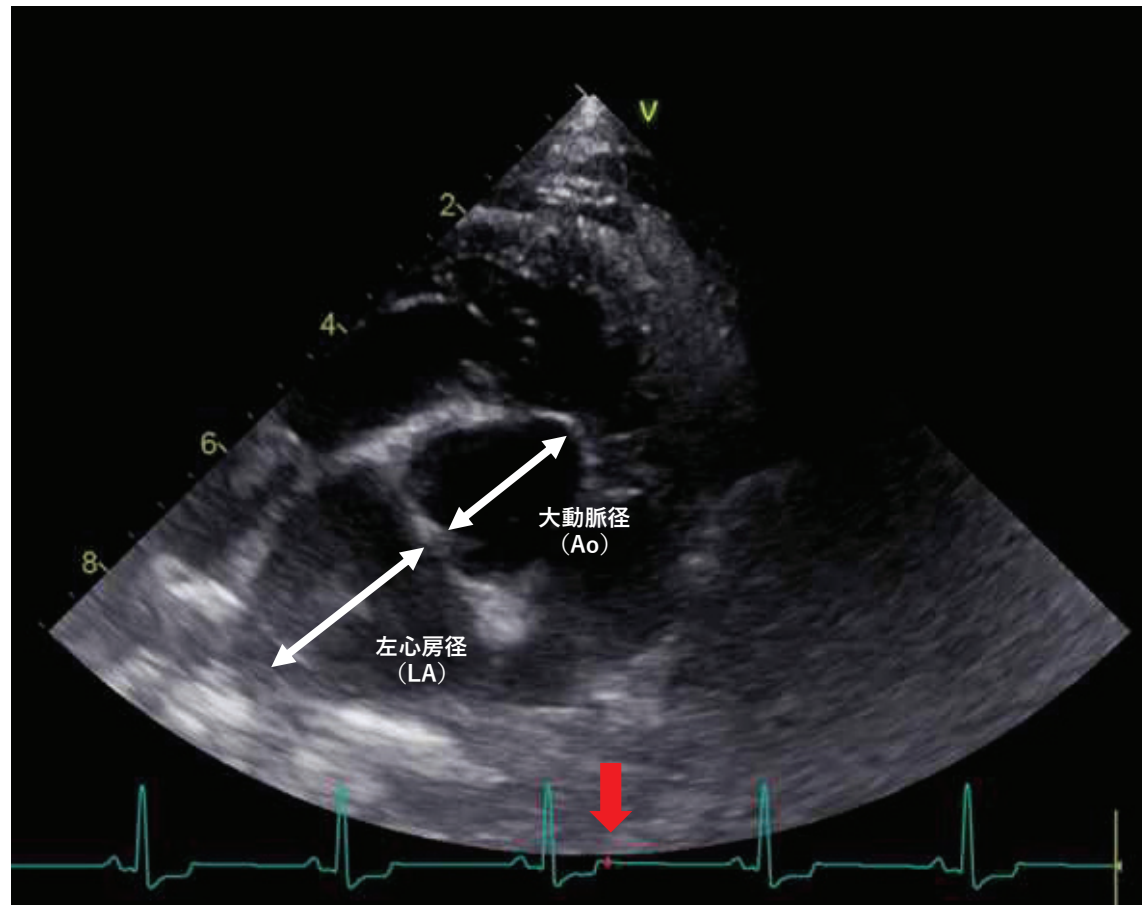


Fig. 1-5. 左心房－大動脈径比（LA/Ao）の測定方法  
超音波検査の画面上に、心電図を同期させた。右傍胸骨左室短軸断面像腱索レベルの  
Bモード画像において、左心房径（LA）ならびに大動脈径（Ao）を計測し、LA/Aoを算出した。  
心電図上の黄色矢印は拡張末期、赤矢印は収縮末期に一致している。

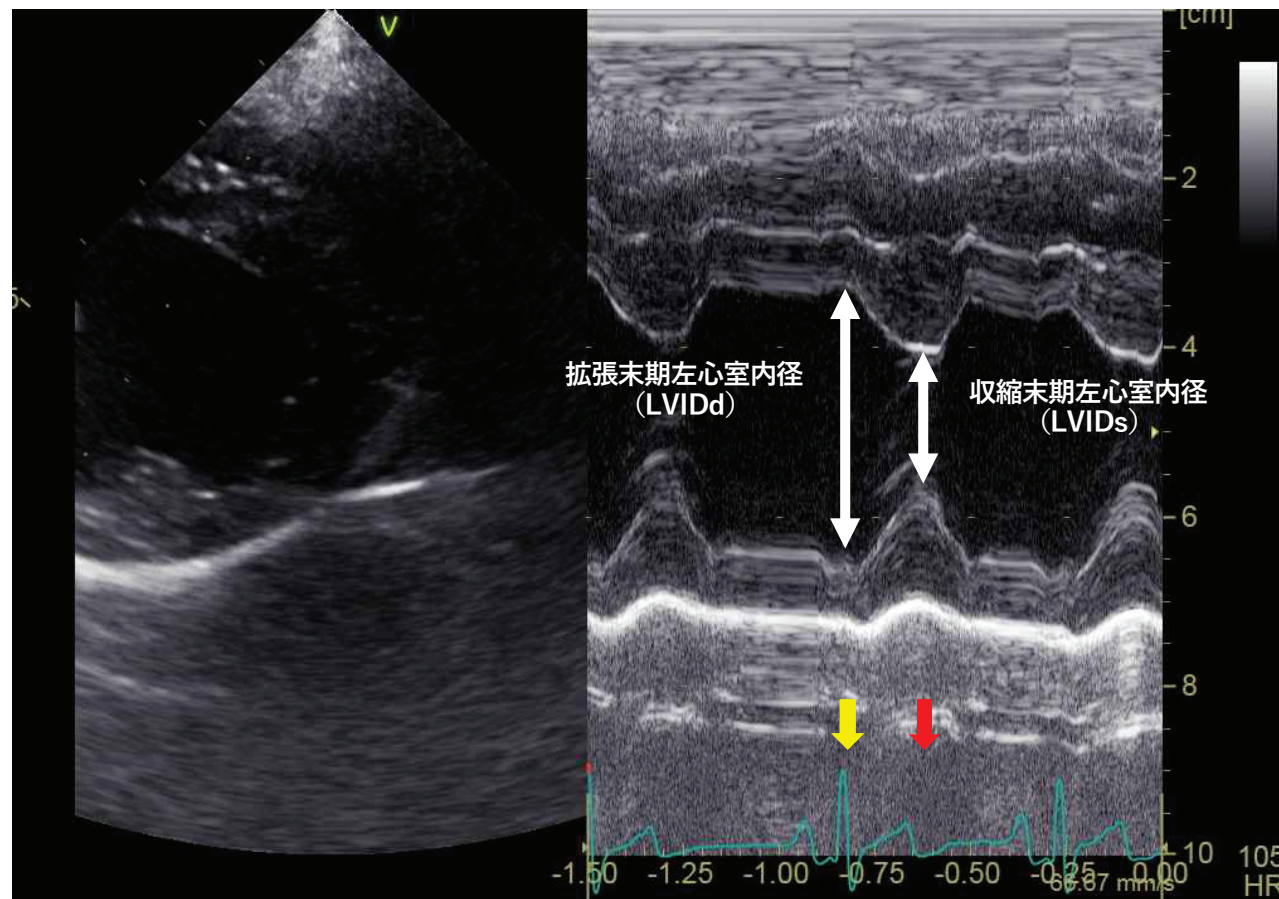


Fig. 1-6. 左心室内径短縮率（FS）の計測方法

超音波検査の画面上に、心電図を同期させた。右傍胸骨左室短軸断面像腱索レベルの M モード画像において、拡張末期左心室内径（LVIDd）、収縮末期左心室内径（LVIDs）、および FS を計測した。

FS は、 $FS (\%) = \{(LVIDd - LVIDs) / LVIDd\} \times 100$  の式により算出した。

心電図上の黄色矢印は拡張末期、赤矢印は収縮末期に一致している。



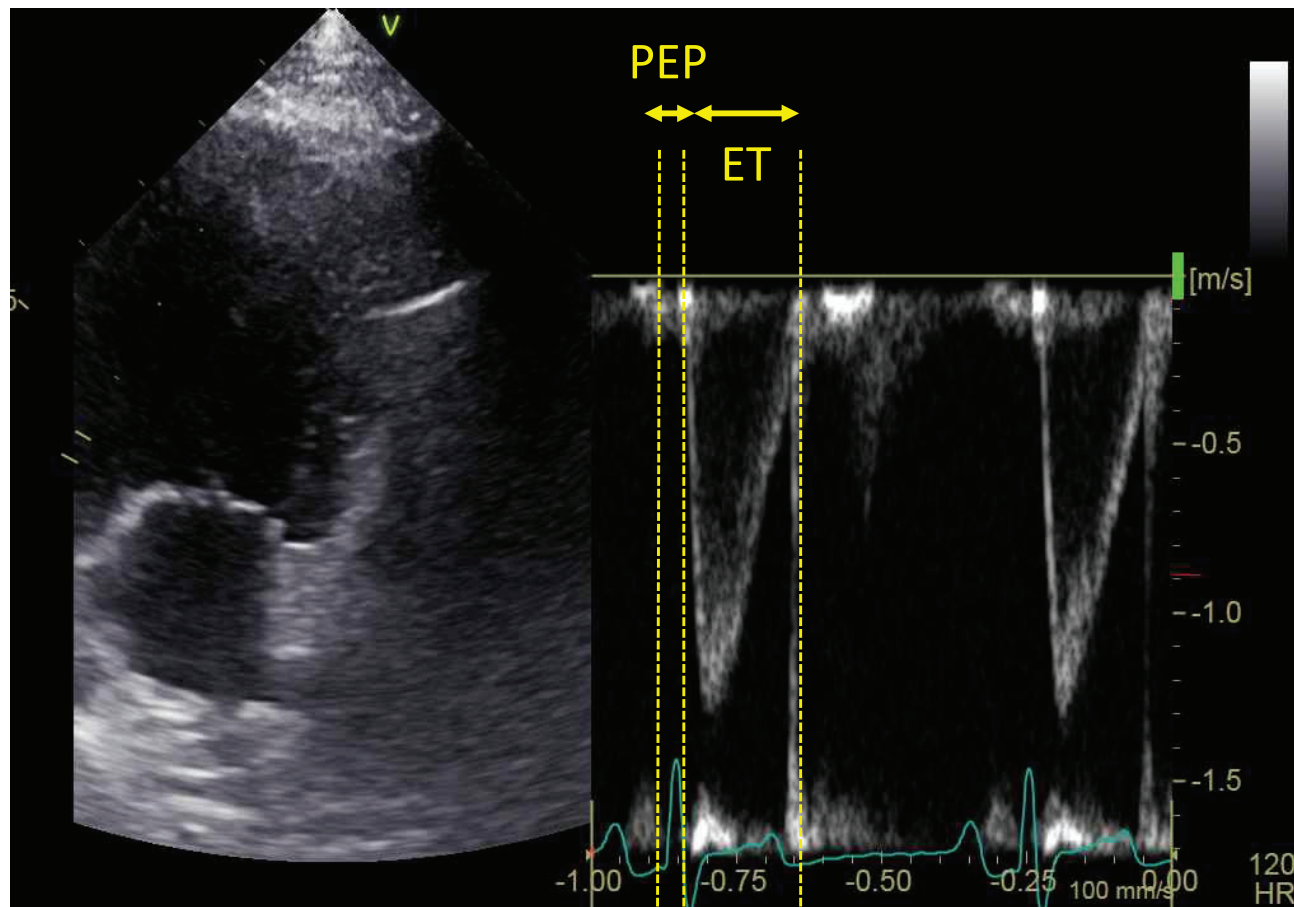


Fig. 1-7. 大動脈弁口波形での前駆出時間/駆出時間の計測方法

左傍胸骨心尖部五腔断面により大動脈弁口部を描出し、ドプラモードを用いて同部位での血流波形を得た。PEP; 心電図の Q 波の開始から血流波形までの前駆出時間、ET; 血流波形開始から終了までの駆出時間

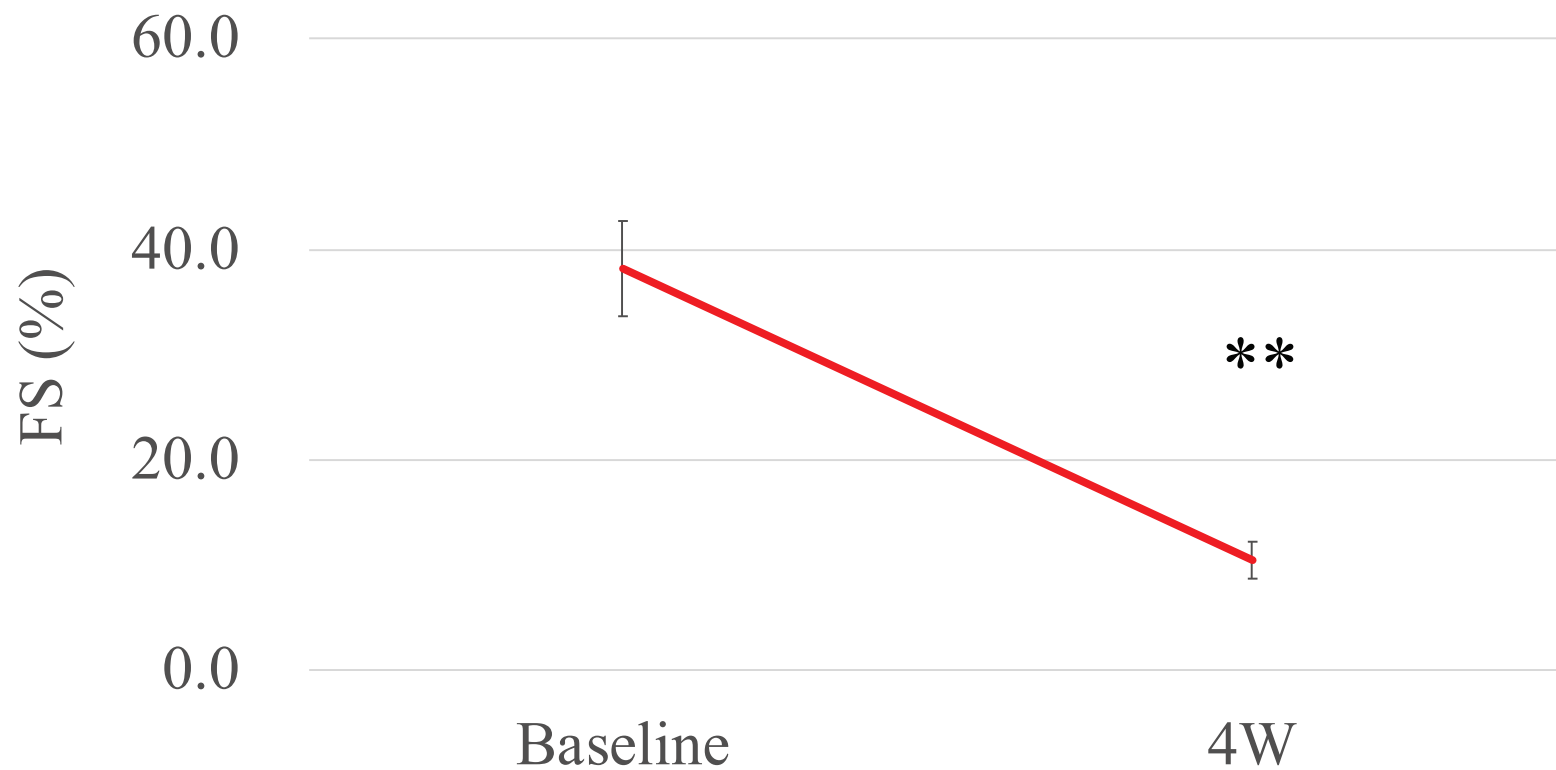


Fig. 1-8. 心臓超音波検査により測定した左心室内径短縮率（FS）の経時的変化  
測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において  
FS の有意な低下が認められた。

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

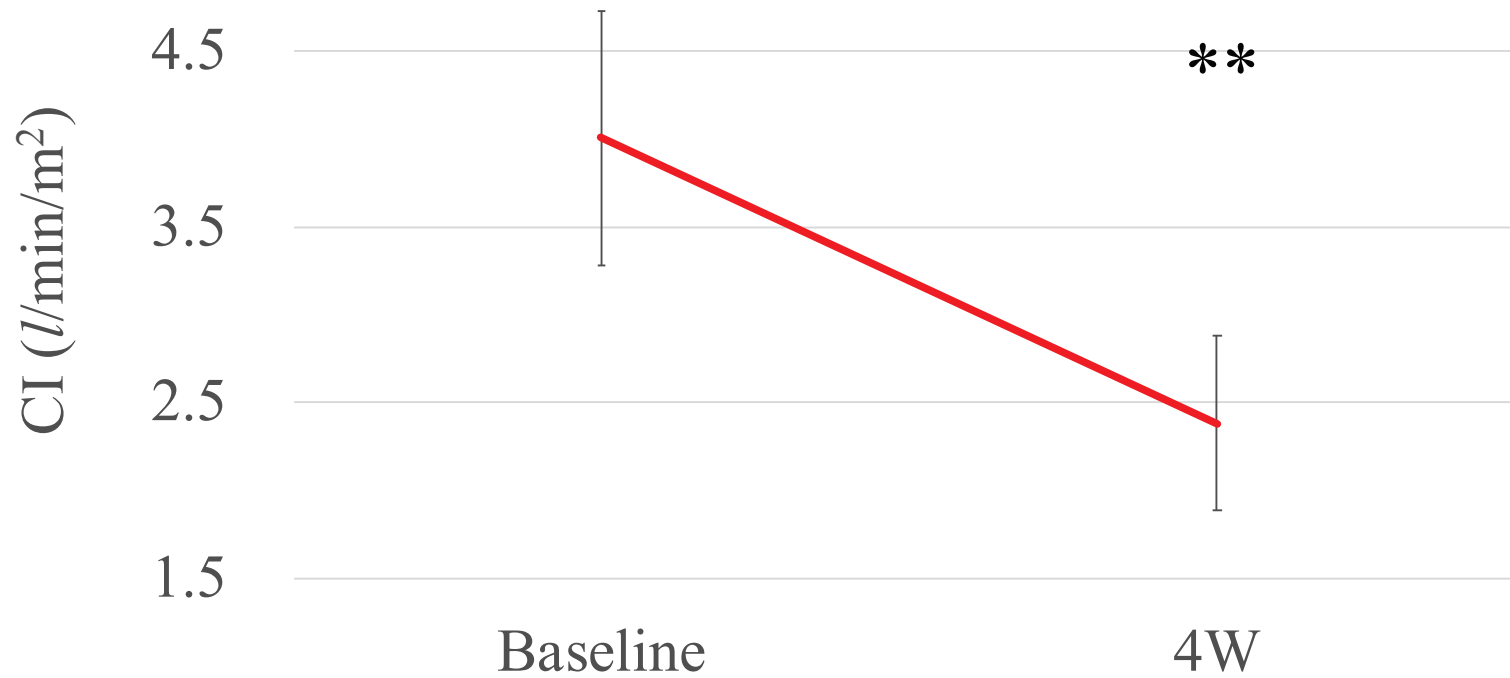


Fig. 1-9. 心臓超音波検査により測定した心係数（CI）の経時的変化

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において CI の有意な低下が認められた。

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline



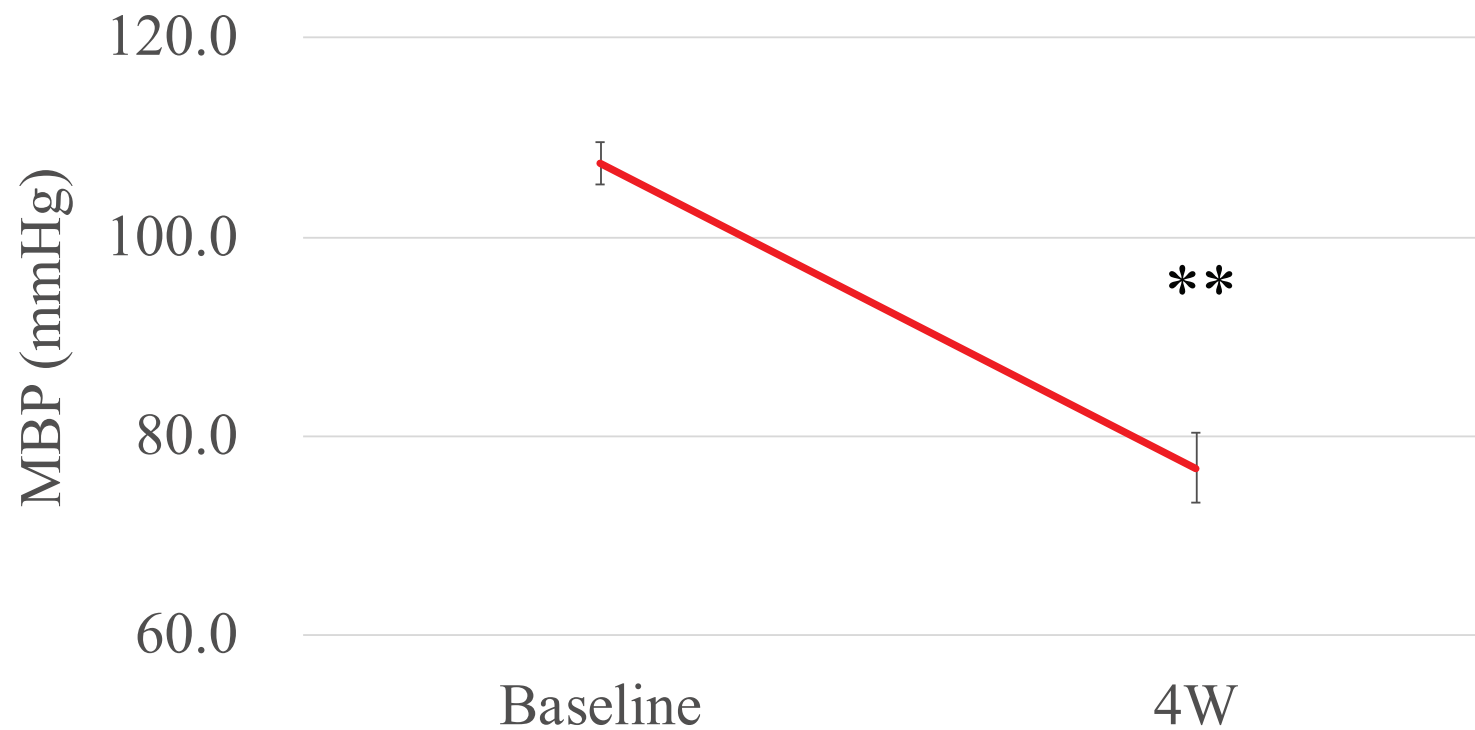


Fig. 1-10. 平均血圧（MBP）の経時的变化

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において MBP の有意な低下が認められた。

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

Table. 1-1. 心臓超音波測定値の経時的変化

Parameter	Baseline			4W			
HR (bpm)	130	±	20	168	±	17	**
LA/Ao	1.3	±	0.1	1.8	±	0.3	**
LVIDd (mm)	30.5	±	4.7	39.3	±	2.2	**
LVIDs (mm)	18.7	±	2.5	35.3	±	2.4	**
FS (%)	38.2	±	4.6	10.5	±	1.7	**
PEP/ET	0.3	±	0.0	0.5	±	0.0	**
SV (ml)	16.3	±	3.2	7.9	±	1.8	**
CO (l/min)	2.1	±	0.3	1.3	±	0.3	**
CI (l/min/m <sup>2</sup> )	4.0	±	0.7	2.4	±	0.5	**

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,  
 HR; 心拍数, LA/Ao; 左心房－大動脈径比, LVIDd; 拡張末期左心室内径,  
 LVIDs; 収縮末期左心室内径, FS; 左心室内径短縮率,  
 PEP/ET; 前駆出時間－駆出時間比, SV; 左心室 1 回拍出量,  
 CO; 心拍出量, CI; 心係数

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

Table. 1-2. 血圧測定値の経時的変化

Parameter	Baseline			4W			
SBP (mmHg)	152.7	±	2.1	110.8	±	7.5	**
MBP (mmHg)	107.4	±	2.1	76.8	±	3.5	**
DBP (mmHg)	85.6	±	1.8	60.0	±	3.5	**

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

SBP; 収縮期血圧, MBP; 平均血圧, DBP; 拡張期血圧

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

Table. 1-3. 中心静脈圧が baseline においては 5 mmHg、4W においては 5, 10 あるいは 15 mmHg であると仮定した場合の体血管抵抗

	mmHg	Period					
		baseline			4W		
	5	4,002	±	709	4,764	±	1,247
SVR (dynes×sec×cm <sup>-5</sup> )	10				4,418	±	1,171
	15				4,089	±	1,095

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

SVR; 体血管抵抗

## 第 2 章

### 高頻度心室刺激犬の脾臓の血流量ならびに 形態的变化の評価

## 1. 緒言

心筋症、弁膜症をはじめとした様々な心疾患は、心臓のポンプ機能の低下を引き起こす。そして、最終的には全身臓器への十分な血液を拍出できなくなり、心不全の病態へと進行する[6, 54]。このような血行動態の変化により、心不全では腎臓、肝臓および消化管といった腹部臓器に対して、低灌流に基づく様々な障害を引き起こすことになる[8-10]。しかしながら、これまでに、心不全による膵臓の低灌流性障害についてはほとんど検討されておらず、その詳細は明らかとされていない。

近年、犬において、心不全と膵腺房細胞傷害の間に関連性があることが示唆された。Han らは、僧帽弁閉鎖不全症により心不全に陥った犬において、その重症度ステージに応じ、膵腺房細胞傷害の存在を反映するとされる血清犬膵特異的リパーゼ免疫活性 (canine pancreatic lipase immunoreactivity; cPLI) 濃度の値が有意に上昇すると報告した[12]。そして、彼らは、心不全により CO が低下し、膵臓の灌流状態が悪化した結果、膵腺房細胞傷害が引き起こされたのではないかと推測している[12]。しかしながら、この研究内では、CO や膵臓血流量は測定されておらず、心不全により膵臓血流量がどのように変化するのかは明らかとなっていない。さらに、血流量の低下により、実際に膵臓組織にどのような影響が及ぼされるかについても不明なままである。

第 1 章では、健常ビーグル犬 5 頭に対し、4 週間の RVP を与え、心臓超音波検査ならびに血圧測定により全身血行動態の変化を評価した。そして、左心室の収縮機能が著しく低下し、CO ならびに動脈血圧値の十分な低下が確認されたことから、心不全と腹部臓器血流量の関係性を評価するのに適切なモデルであると判断した。そこで、本章では、心不全と膵腺房細胞傷害の関連性を検討するにあたり、以下の 2 つの目的を設定し、研究を進めた。第 1

の目的として、本モデル犬の脾臓血流量を測定することにより、CO 低下時における脾臓血流量の変化を捉えた。そして、第 2 の目的として、これら犬の脾臓に対し病理組織学的検査を行い、CO の低下により脾臓組織に変化が引き起こされるか否かを顕微鏡学的に検討した。

## 1. 材料と方法

### (a) 心機能と臍臓血流量の評価

#### 2(a)-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規程に準拠し遂行した。(承認番号：第31-2)

#### 2(a)-2. 供試動物

第1章と同様に、全身状態に問題がないと判断した実験用ビーグル7頭を供試した。性別は雄3頭、雌4頭、年齢は2～3歳、体重は9.2～10.4 kg（中央値：9.6 kg）であった。供試動物の飼養環境は第1章と同様とした。

#### 2(a)-3. 実験犬の作出

第1章と同様の方法を用いて、前述のビーグル犬7頭に全身麻酔下で右心室に室刺激電極リードを縫着した。14日間の術後養生期間の後、心室刺激電極リードと体外式ペースメーカーを接続し、RVPを開始した。第1章と同様に、RVPの設定は、4V、260回/分、4週間とした。

#### 2(a)-4. 実験プロトコール

第1章と同様に、RVPの開始前（Baseline）、4週間目（4W）を測定ピリオドとして、以下の各種検査を実施した。また、各種検査は、第1章と同様の条件下において実施した。

##### 2(a)-4.1 心臓超音波検査

第1章と同様の方法を用いて心臓超音波検査により心機能を評価した。



右傍胸骨左室短軸断面像心基部レベルの B モードにおいては LA/Ao を、  
腱索レベルの M モードにおいては、LVIDd、LVIDs、および FS を計測した。

左傍胸骨心尖部五腔断面のドプラモードにおいては、大動脈弁口部波形から SV、CO ならびに PEP/ET を計測した。また、第 1 章と同様に、CO に対する個体間の体格差の影響を是正した値である CI を算出した。

#### 2(a)-4.2 血圧測定

第 1 章と同様の方法を用いて、オシロメトリック法により血圧測定を行った。

SBP、MBP および DBP を 3 回以上繰り返し計測し、得られた値の誤差が 3 mmHg 以内である場合に、3 回の平均値を測定値として採用した。

また、第 1 章と同様に、Baseline において CVP を 5 mmHg、4W において 5 mmHg、10 mmHg、あるいは 15 mmHg と仮定し、SVR を算出した。

#### 2(a)-4.3 造影超音波検査

コントラストハーモニックイメージング機能を搭載した超音波装置 (Logiq7, GE ヘルスケアジャパン, 東京)、6.0 - 9.0 MHz リニアプローブ (9L probe, GE ヘルスケアジャパン, 東京) を使用して脾臓血流量を測定した。コントラストモードとして、振幅変調法を使用した。Mechanical Index は、造影剤であるマイクロバブル (microbubble; MB) の破壊が最小限に抑えられる程度の低音圧である 0.26 に設定した。フォーカスは脾臓直下に設定し、ゲインは個体ごとに最適な値を選択し、Baseline、4w において各個体で統一した。動物を仰臥位に保定し、十二指腸と並走する脾右葉の横断面を B モードで描出した。脾臓の同一箇所を描出するために、Baseline ならびに 4w ともにプローブ操作は各個体で統一した。

造影剤は、注射用ペルフルブタン (ソナゾイド®、第一三共株式会社、東

京)を使用した。過去の報告に従い、0.05 ml/kg のソナゾイド®を生理食塩水で 5 ml に希釈した。事前に橈側皮静脈に設置した 22 G 留置針およびそれに接続した 21 G 翼状針から、シリンジポンプ (Top-5300, 株式会社トップ, 東京, 日本) を用いて 1 分間かけて静脈内投与した [55-57]。ソナゾイド®が体内に入った時間を 0 秒としてタイマーを起動させ、腓右葉の描出した断面を維持しながら 300 秒間連続スキャンした。得られた連続画像を超音波装置のハードディスクに Low data として動画保存した。

保存した Low data を基に、腓実質血流の定量化を行った。輝度の測定には、超音波装置に内蔵されたソフトウェアを利用した。血管を避けた腓実質に直径 2mm の円形の関心領域 (region on interest; ROI) を 3 箇所設定し、輝度を測定した (Fig. 2-1.)。0 秒から 160 秒までにおける 5 秒毎、ならびに 160 秒から 300 秒までにおける 10 秒毎における 3 つの ROI の輝度(絶対値)を計測し、その平均値を各時点の輝度とした。さらに、0 秒の輝度を基準にした各時点における輝度増加率 (0 秒に対する相対値) を算出し、輝度増加率-時間曲線 (time intensity curve; TIC) を作出した (Fig. 2-2.)。呼吸によって腓臓の位置が変動してしまう場合には、測定箇所が変動しないように、3 部位の ROI を手動で追従した。

作出した TIC を基に、血流の定量的評価の指標を算出した。時間的指標として、ピーク到達時間 (time to peak; TP)、初期上昇時間 (time to initial up-slope; TTU)、ウォッシュアウト時間 (time to washout; TTW) を算出した。また、輝度増強指標として、最高輝度増加率 (PI; peak intensity)、曲線下面積 (AUC; area under the curve) を算出した。TP は造影開始から最初に得られたピークまでの時点、TTU は造影開始後、輝度増加率が PI の 30%まで増加した時点、TTW はピーク後に輝度増加率が PI の 30%まで減少した時点と定義した [55-57] (Fig. 2-2.)。

## 2(a)-5. 統計手法

得られた各測定値が正規分布しているか否かを Shapiro-Wilk test により評価した。膀胱質の TIC における各時点の輝度増加率は、平均値±標準誤差として示した。他の全てのデータは平均値±標準偏差として示した。心臓超音波検査、血圧測定および輝度増加率以外の造影超音波検査の各測定項目に関しては、Paired t-test を使用して、Baseline ならびに 4W における比較を行った。各時点における輝度増加率に関しては、Friedman Test with post hoc Wilcoxon signed- rank test を使用して、Baseline および 4W における比較を行った。統計解析はパソコン用ソフトウェア (BellCurve for Excel, 株式会社社会情報サービス, 東京, 日本) を用いて行い、いずれの検定も  $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

## (b) 脾臓組織の病理組織学的評価

### 2(b)-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規程に準拠し遂行した。(承認番号：第31-2)

### 2(b)-2. 供試動物

前述の RVP 犬 7 頭を使用した。

### 2(b)-3. 実験プロトコール

前述したように、Baseline ならびに 4 W を測定ピリオドとして、以下の各種検査を実施した。

#### 2(b)-3.1 脾臓組織のサンプリング

Baseline: 脾臓のサンプリングは、ペースメーカー埋め込み手術時に、全身麻酔下において開腹下において行なった。全身麻酔を施した供試動物を仰臥位にし、腹部正中切開を行った。そして、脾臓の右葉あるいは左葉を露出した。3-0 のポリグリコマー縫合糸(バイオシン, コヴィディエン ジャパン, 東京, 日本)にて脾臓の末端から 1cm ほどの箇所を結紮し、脾臓部分切除術を行った (Fig. 2-10.)。サンプリング部位は、右葉 4 頭、左葉 3 頭となるようにランダムに設定した。その後、常法に従い閉腹した。サンプリングした脾臓組織を 10%中性緩衝ホルマリン液により固定した。

4W: RVP 開始から 4 週間目において再び全身麻酔下を施し、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル, 共立製薬, 東京, 日本) 30~50 mg/kg の静脈内投与 (to effect) により供試動物に安楽死処置を施し、その直後に脾臓全体を摘出した。得られた脾臓組織を 10%中性緩衝ホルマリン液により固

定した。

### 2(b)-3.2 病理組織学的検査

Baselineならびに4Wで事前に固定した膵臓組織の組織片をパラフィン包埋した後、 $2\mu\text{m}$ の厚さに薄切した。そして、作製したパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin and eosin; HE）にて染色し、光学顕微鏡を用いて膵臓組織の病理組織学的検討を行った。Baselineでは部分切除した膵臓組織片を評価した。4Wでは右葉、左葉、膵体部およびBaselineのサンプリングにおける結紮/切断面をそれぞれ切り出し、膵臓の全領域を評価した（Fig. 2-11.）。

病理組織学的検査の半定量的評価として、各部位において40倍の対物レンズを使用し、連続した20視野を検索して0～3のグレード分類を行なった。各視野のグレード分類は、膵腺房細胞におけるチモーゲン顆粒の程度を基に行い、以下のように評価することとした。チモーゲン顆粒を含む膵腺房細胞が全体の5%未満である場合は「0」、5-25%である場合は「1」、25-50%である場合は「2」、51%以上である場合は「3」とした。4Wにおいては、右葉、左葉および膵体部における各部位をスコアリングし、その平均値を採用した。評価の範囲は任意に決定した。

### 2(b)-3.3 免疫組織化学検査

Baselineならびに4Wにおける膵臓のパラフィン切片を脱パラフィンし、0.3%過酸化水素のメタノール溶液に30分間浸して、内因性ペルオキシターゼを不活性化した。次に、抗体が組織成分に非特異的に結合することを防ぐため、ブロッキング溶液として10%正常ヤギ血清を使用し、30分間のインキュベートを行なった。一次抗体として、アンチトリプシン抗体（×50、ウサギモノクローナル、アブカム、英国）を選択し、4℃にて一晩のインキュベート

を行なった。次に、ウサギ免疫グロブリンGと結合する標識二次抗体として、ポリマー試薬（Envision solution、ダコ、デンマーク）を選択し、室温にて30分間のインキュベートを行なった。洗浄には、トリス緩衝生理食塩水（0.15 M NaCl、0.05 M Tris-HCl、pH 7.6）を使用した。発色基質液として、3,3'-ジアミノベンジジンを使用し、抗体結合部位を発色させた。その後メイヤーのヘマトキシリンを使用して対比染色を行い、Baselineならびに4Wにおけるチモーゲン顆粒内のトリプシノーゲンの含有程度を評価した。

#### 2(b)-3.4 血液化学的検査

本研究において、膵腺房細胞傷害を検出するためのバイオマーカーとして、cPLIを利用した。血液サンプルは頸静脈より採取した。血液サンプルに対し、1510 g x 10 分の遠心分離を行い、血清を分離した。得られた血清を外部の検査機関（アイデックスラボラトリーズ、東京）に冷蔵送付し、血清cPLI濃度の測定を依頼した。血清cPLI濃度はELISA法により測定された（参考基準値, 200  $\mu$ g/L 未満）[58]。

#### 2(b)-4. 統計手法

得られた各データが正規分布している否かをShapiro-Wilk testにより評価した。病理組織的検査におけるスコアは平均値±標準誤差として示した。血清cPLI濃度は、平均値±標準偏差として示した。各スコアに関しては、Wilcoxon signed-rank testを使用して、Baselineならびに4Wにおける比較を行なった。血清cPLI濃度に関しては、Paired t-testを使用して、Baselineならびに4Wにおける比較を行なった。統計解析はパソコン用ソフトウェア（BellCurve for Excel, 株式会社社会情報サービス, 東京, 日本）を用いて行い、いずれも $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

## 1. 結果

### (a) 心機能と臓器血流量の評価

#### 3(a)-1. 心臓超音波検査

FS、SV、CO および CI に関して、Baseline と比較して、4W において低下した (FS, SV および CI;  $p < 0.01$ , CO;  $p < 0.05$ )。また、LA/Ao、LVIDd、LVIDs および PEP/ET に関して、Baseline と比較して 4W において増加した (いずれも  $p < 0.01$ ) (Fig. 2-3, 4) (Table. 2-1.)。

#### 3(a)-2. 血圧測定

SBP、MBP および DBP に関して、Baseline と比較して、4W において低下した (いずれも  $p < 0.01$ ) (Fig. 2-5.) (Table. 2-2.)。

SVR に関して、CVP 値を Baseline において 5 mmHg、4W において 5 mmHg、10 mmHg あるいは 15 mmHg と仮定した場合のいずれの組み合わせにおいても、Baseline と比較して、4W において有意差は認められなかった (Table. 2-3.)。

#### 3(a)-3. 造影超音波検査

PI ならびに AUC に関して、Baseline と比較して、4W において低下した (いずれも  $p < 0.01$ ) (Fig. 2-6, 7.)。また、TP は延長した ( $p < 0.01$ )。TTU ならびに TTW においては、有意差は認められなかった (Table. 2-3.)。

ソナゾイド®静注後 20 秒から 140 秒における各時間、240 秒、および 250 秒における輝度増加率は、Baseline と比較し 4W において低下した (20 秒、125 秒～140 秒、240 秒および 250 秒;  $p < 0.05$ 、25 秒～120 秒;  $p < 0.01$ ) (Fig. 2-8.) (Fig. 2-9.)。

## (b) 膵臓組織の病理組織学的評価

### 3(b)-1. 病理組織学的検査

Baselineでは、サンプリングの際に結紮/切断した箇所を含め、病理組織学的な異常所見は認められなかった。

4Wでは、Baselineと比較して、7頭全てにおいてチモーゲン顆粒の減少を伴う膵腺房細胞の萎縮が認められた ( $p < 0.01$ ) (Table. 2-5.) (Fig. 2-12.)。これは、右葉、左葉および膵体部の各部位において認められた。また、病変の程度に関して、各部位における差はなかった。毛細血管の拡張、血液成分の漏出ならびに間隙の拡大をはじめとしたうっ血所見は認められなかった。Baselineで結紮/切断した箇所においても、膵腺房細胞の萎縮以外の異常所見は認められなかった。また、その病変の程度も同様なものであった。

### 3(b)-2. 免疫組織化学検査

Baselineでは、HE染色にて確認された膵腺房細胞内のチモーゲン顆粒領域内において、トリプシノーゲン陽性反応が認められた。

4Wにおいては、7頭全てにおいてトリプシノーゲン陽性反応の減弱傾向が認められた (Fig. 2-13.)。

### 3(b)-3. 血液化学的検査

血清 cPLI 濃度に関して、Baselineと比較して、4Wにおいて有意差は認められなかった。(Table. 2-6.)



#### 4. 考察

本章では、第 1 章において、心不全と腹部臓器血流量の関係性を評価するのに適切なモデルであると判断した RVP 犬を新たに 7 頭作製し、CO ならびに血圧低下時における脾臓血流量の変化を検討した。

今回、脾臓の血流量を造影超音波検査により測定した。造影超音波検査は、時間経過による造影剤の輝度変化を基に TIC を作製することにより、対象とした臓器や病変部の血流動態の経時的・定量的評価が可能となる [55-57,59-61]。使用される造影剤は MB であり、超音波に対する強い反射源として作用することで、微小な毛細血管網のエコー源性を増強する [62,63]。なかでもソナゾイド®は、低音圧性の造影剤であるため、容易に崩壊しない性質を有し、長時間の観察を可能としている [63,64]。また、高音圧の超音波を照射することにより、速やかに MB は破壊されるため、繰り返しの検査が可能である [62]。これらの特徴から、臓器の血流評価法として広く使用されている [55-57,59,61,65]。

脾実質における 4W の TIC において、PI ならびに AUC が Baseline と比較して有意に低下した。PI は ROI 内における MB の最大流入量、AUC は観察時間内における ROI 内へと流入した MB の総流入量を示している [59,60,66]。そのため、脾実質における PI ならびに AUC の低下は、観察時間内における脾実質への血流量が低下していることを意味している。また、4W の TIC において、MB 静注後 20 秒から 140 秒までの全ての時相における輝度増加率が、Baseline と比較して有意な低下を示した。これらの時相は、脾実質の輝度が上昇し始め、その後ピークならびにプラトーを形成する期間に相当していた。人医療においては、ピークを含むこの輝度上昇部分は、動脈相を反映するとされている [66]。TIC の形状は人と犬の間に大きな差異は認められないことが知られている [50,60,66]。そのため、本モデル動物においても、4W

において示唆された膵実質血流量の低下は、動脈血流量の低下に起因するものと考えられた。

本章における 4 週間の RVP による心機能ならびに血圧値の変化は、第 1 章における 5 頭のビーグル犬におけるものと完全に一致したものであった。すなわち、本章においても、左心室収縮力ならびに CO の低下に基づく MBP の低下が認められた。動脈血圧、なかでも MBP は、末梢臓器まで血液を送る駆動圧を反映していると考えられている[27,51]。そのため、今回の供試動物において認められた膵実質血流量の低下は、CO の低下により引き起こされたものと結論付けた。また、4W において、Baseline と比較して TP の延長が認められた。TP の延長は MB の流入速度の低下を示していることから、動脈血流量の低下とともにその流速も低下していることが明らかとなった。

病理組織学的検査では、膵臓の広範囲にチモーゲン顆粒の減少を伴う膵腺房細胞の萎縮が認められた。膵腺房細胞の萎縮が認められる疾病あるいは病態として、慢性膵炎や膵外分泌不全が挙げられる[67-69]。特に慢性膵炎は、膵腺房細胞の萎縮に加え、炎症細胞の浸潤ならびに線維化が認められることを特徴としている[68,69]。これまでに、Tanaka らは、膵左葉に流入する膵枝を結紮切離することにより作製した慢性膵臓虚血モデル犬において、膵臓の虚血により膵腺房細胞の萎縮/脱落に続く炎症細胞の浸潤および線維化など、慢性膵炎の病態に酷似した病理組織学的所見が認められたと報告した[70]。そして、これら膵腺房細胞の萎縮/脱落をはじめとした病理学的変化は、経時的に増強されることを明らかとした[70]。そのため、本研究において認められた膵腺房細胞の萎縮は、膵臓の血流量の低下に起因するものであり、さらには炎症細胞の浸潤や線維化の前段階に位置していると考えられる。細胞の萎縮は、組織における虚血/低灌流性変化の一つである[71-73]。一般的に細胞の萎縮のみであれば炎症反応は惹起されない[74]。しかしながら、この低酸素状態が長期化、あるいはより重度なものとなると、細胞は二次性の

壊死に陥り炎症反応が惹起される[74,75]。特に膵腺房細胞においては、酵素原顆粒が細胞内に逸脱することにより、さらなる炎症反応が引き起こされることになる[13]。そのため、心不全状態がより長期に及び、それに伴い膵臓血流の低下も持続する場合には、今回認められた膵臓組織の病理学的所見はより重症化にシフトする可能性があるかと推測された。

一方、膵外分泌不全は、何らかの原因で膵腺房細胞が萎縮・脱落し、外分泌機能を担う組織の大部分が消失することにより、消化吸收活動に支障をきたした病態と定義されている[69]。そのため、本研究において認められた病理学的変化は、この病態に関連したものである可能性も否定できない。しかしながら、膵外分泌不全では、膵腺房細胞の萎縮に先行してリンパ球ならびに形質細胞の浸潤が認められるとされている[76]。このことから、膵外分泌不全は自己免疫性疾患を基礎とし、その炎症により膵腺房細胞の萎縮・破壊されることで引き起こされるのではないかと考えられている[77,78]。そのため、本研究において供試動物に認められた病理学的変化は、膵外分泌不全の病態を反映するものではなく、膵炎の前段階であると解釈するのが妥当であると考えた。

チモーゲン顆粒内には、プロテアーゼ、アミラーゼおよびリパーゼなど様々な消化酵素群が、酵素前駆体(不活化型)の状態豊富に貯蔵されている[79]。中でも、タンパク質分解作用を有するトリプシンの酵素前駆体であるトリプシノーゲンは、膵臓の外分泌機能を担う重要な酵素前駆体の一つである[79]。本研究では、免疫組織化学検査によりトリプシン染色を実施した結果、トリプシノーゲン陽性反応の減弱傾向が認められた。そのため、今回、免疫組織化学検査により認められたこの反応は、HE染色で認められたチモーゲン顆粒の減少を裏付けるものであった。

また、今回、7頭すべての犬において、同様の病理学的所見が明瞭に認められたが、その程度の差異も存在した。これまでに、前田らは、浮腫や炎症

反応および繊維化など、膵臓の虚血により引き起こされる病理組織学的変化は、個体により重症度に差が生じることを報告している[80]。そのため、今回、血流低下に対する膵腺房細胞の抵抗性における個体差によるものと考えられる。また、本研究において、供試動物の膵臓組織のサンプリングは絶食処置下で実施されたため、食後における酵素原顆粒の生理的な減少の影響は否定的であると判断した[81]。

一方で、供試動物の膵臓組織において、酵素原顆粒の減少を特徴とした膵腺房細胞萎縮という病理学的変化が認められたにもかかわらず、血清 cPLI 濃度において有意な変化は認められなかった。cPLI は、膵腺房細胞の破壊あるいは細胞膜の透過性亢進により膵臓から血中に放出される血清膵特異的リパーゼの活性を、ELISA 法により測定したものである[82]。そのため、血清 cPLI 濃度は膵腺房細胞傷害を反映するバイオマーカーとして、臨床現場において広く使用されている[58,83]。しかしながら、Trivedi らは、組織学的に膵炎を認めるものの、それが軽度である犬に対する血清 cPLI 濃度の感度は、21-43%と低いことを報告している[58]。本研究において認められた膵腺房細胞の病理学的変化は、壊死や炎症細胞の浸潤などの膵腺房細胞の破壊を伴うものではなかったことから、膵特異的リパーゼの血中への逸脱は発生せず、血清 cPLI 濃度に変化が認められなかったものと推測した。そして、膵腺房細胞の萎縮という、炎症反応の前段階を示す病理学的変化は、血清 cPLI 濃度では推定できないことが示唆された。

本研究にはいくつかの制限事項が存在する。第 1 に、RVP 期間の設定を 4 週間とした点である。一般に、腹部臓器において、低灌流に晒されている期間が持続するほど、生じる病変の程度はより重度となる[13,70,84]。そのため、本研究よりも長期間の RVP を与えることにより、膵腺房細胞の萎縮にとどまらず、さらなる病理学的変化が引き起こされ、それが観察できた可能性

がある。第 2 に、本研究における脾臓の病理学的検討は、Baseline ならびに 4W の 2 つの観察点に限定したものである点である。そのため、脾腺房細胞の萎縮が発現する過程を捉えられておらず、萎縮が生じる前段階において、いかなる病理学的変化が生じていたのか明らかに出来なかった。第 3 に、今回、Baseline における脾臓組織のサンプリングを、全身麻酔下ならびに開腹下において侵襲的に実施した点である。健康な犬の脾臓において、全身麻酔下での適切な脾生検は、生検部の治癒過程における一過性の軽度な炎症反応を除き、病理組織学的影響を及ぼさないとされている [85]。本研究でも Baseline ならびに 4 W において、それぞれの採材部位における病理学的所見を比較したところ、その変化に差異は認められなかった。しかしながら、犬において、外科手術に関連した脾腺房細胞傷害の発生が報告されているため [86-88]、この影響の完全なる除外はできないかもしれない。最後に本研究に供した動物の数が少ないという問題が挙げられる。

以上のことにより、RVP 犬において、心機能の低下により実際に脾臓血流量の低下が引き起こされることが明らかとなった。そして、脾臓血流量の低下は、脾腺房細胞の萎縮という脾臓組織の病理学的変化を引き起こすことが示唆された。しかしながら、この詳細な機序を明らかにすることはできなかった。そのため、今後の章において脾臓血流量の低下と脾腺房細胞萎縮の関連性をより明確にする必要があると考えられた。

## 5. 小括

本章では、7頭の RVP 犬を作出し、心機能検査ならびに血圧測定を行った。その結果、左心室収縮能の低下により CO が低下し、これにより MBP の低下が引き起こされることが判明した。これは第 1 章の研究結果を改めて証明するものであった。

造影超音波検査を使用した腓臓血流量では、RVP により腓臓の血流量の低下が認められた。MBP は、末梢臓器まで血液を送る駆動圧を反映していることから、腓臓血流量の低下は、CO の低下により引き起こされたものと結論付けた。

さらに、腓臓血流量の低下は、腓腺房細胞の萎縮を引き起こすということが明らかとなった。本章において認められた腓腺房細胞の萎縮は、腓臓組織における炎症反応の前段階の病態を示唆するものであり、心不全と腓腺房細胞傷害の関連性を明確にする上で重要な基礎情報となるものであった。



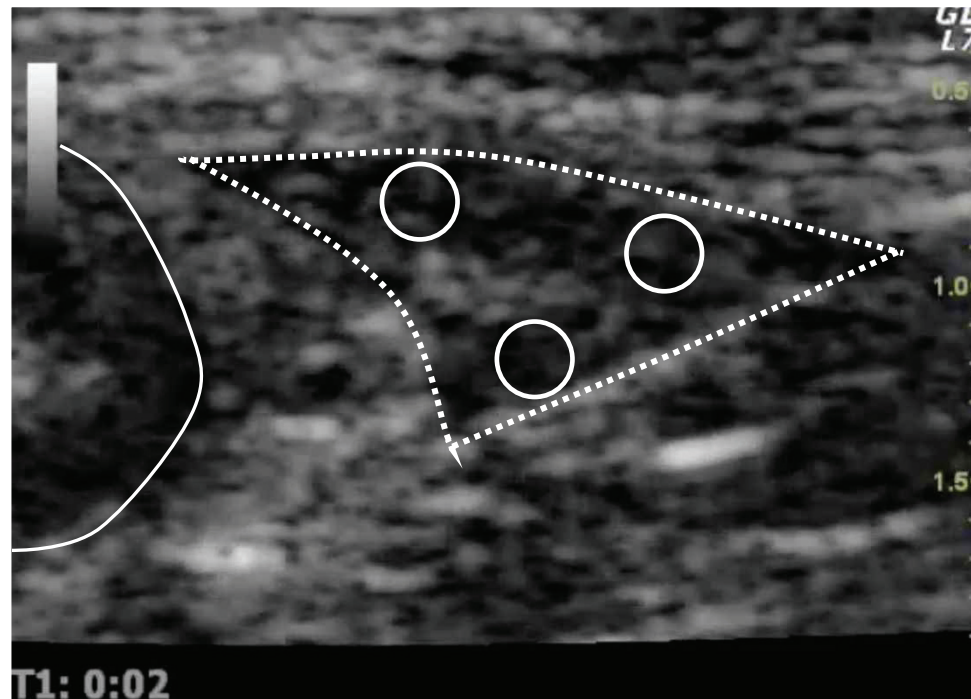


Fig. 2-1. 造影超音波検査において、膵臓右葉の実質に設定した関心領域の位置  
関心領域は、膵臓内の血管を避けた位置に3箇所設定した。  
膵臓右葉を点線で示す。十二指腸を実線で示す。

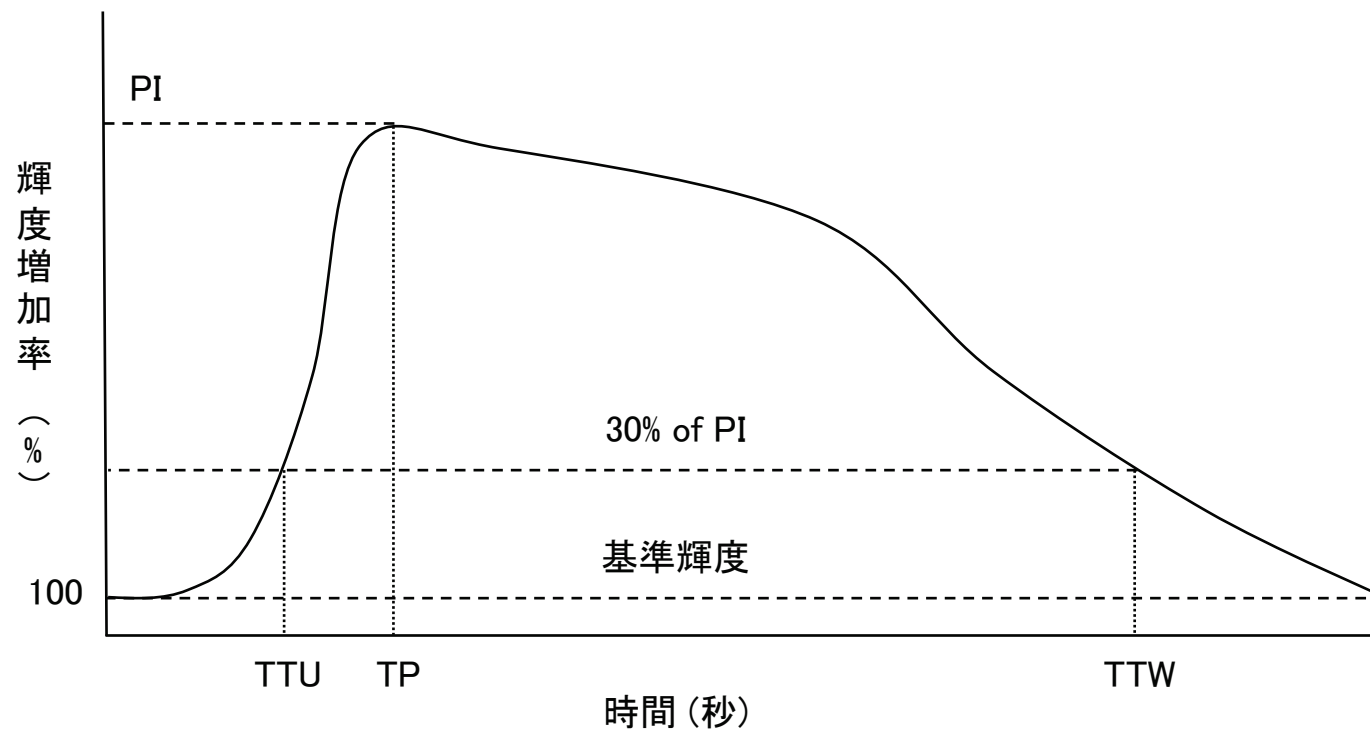


Fig. 2-2. 造影超音波検査における血流指標を図示した輝度増加率－時間曲線（time intensity curve; TIC）の模式図

スキャン開始時の輝度を基準とし、各時点での輝度の増加率をプロットすることにより TIC を作出した。ピーク到達時間（time to peak; TP）は、最高輝度増加率（peak intensity; PI）に達するまでの時間を示す。初期上昇時間（time to initial up-slope; TTU）は、PI の 30% に初めて到達する時間を示し、ウォッシュアウト時間（time to washout; TTW）は、PI 到達後その 30% に初めて到達する時間を示す。曲線下面積（area under the curve; AUC）は、TIC とベースライン強度によって形成される面積を示す。



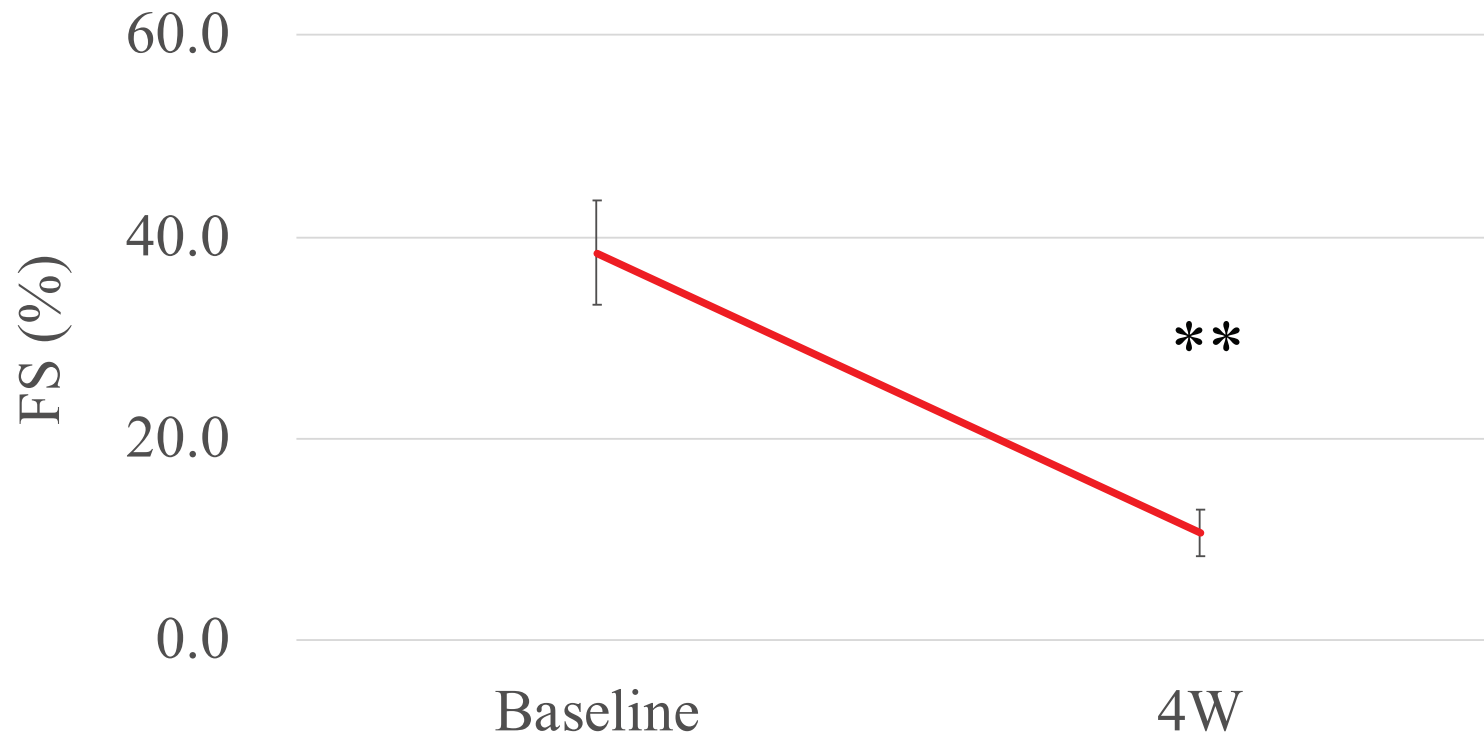


Fig. 2-3. 心臓超音波検査により測定した左心室内径短縮率（FS）の経時的変化  
測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において  
FS の有意な低下が認められた。

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

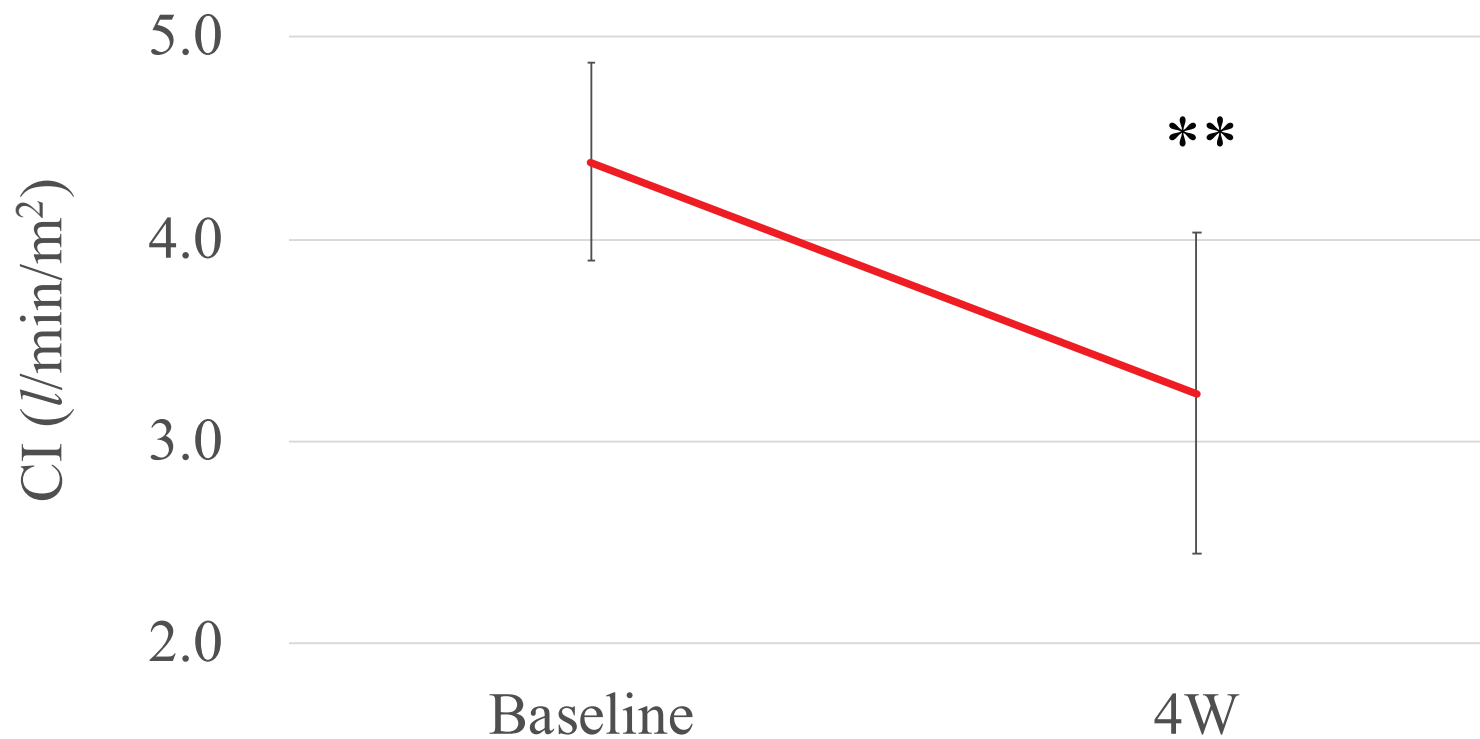


Fig. 2-4. 心臓超音波検査により測定した心係数（CI）の経時的変化

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において CI の有意な低下が認められた。

\*\*；  $p < 0.01$  vs. Baseline

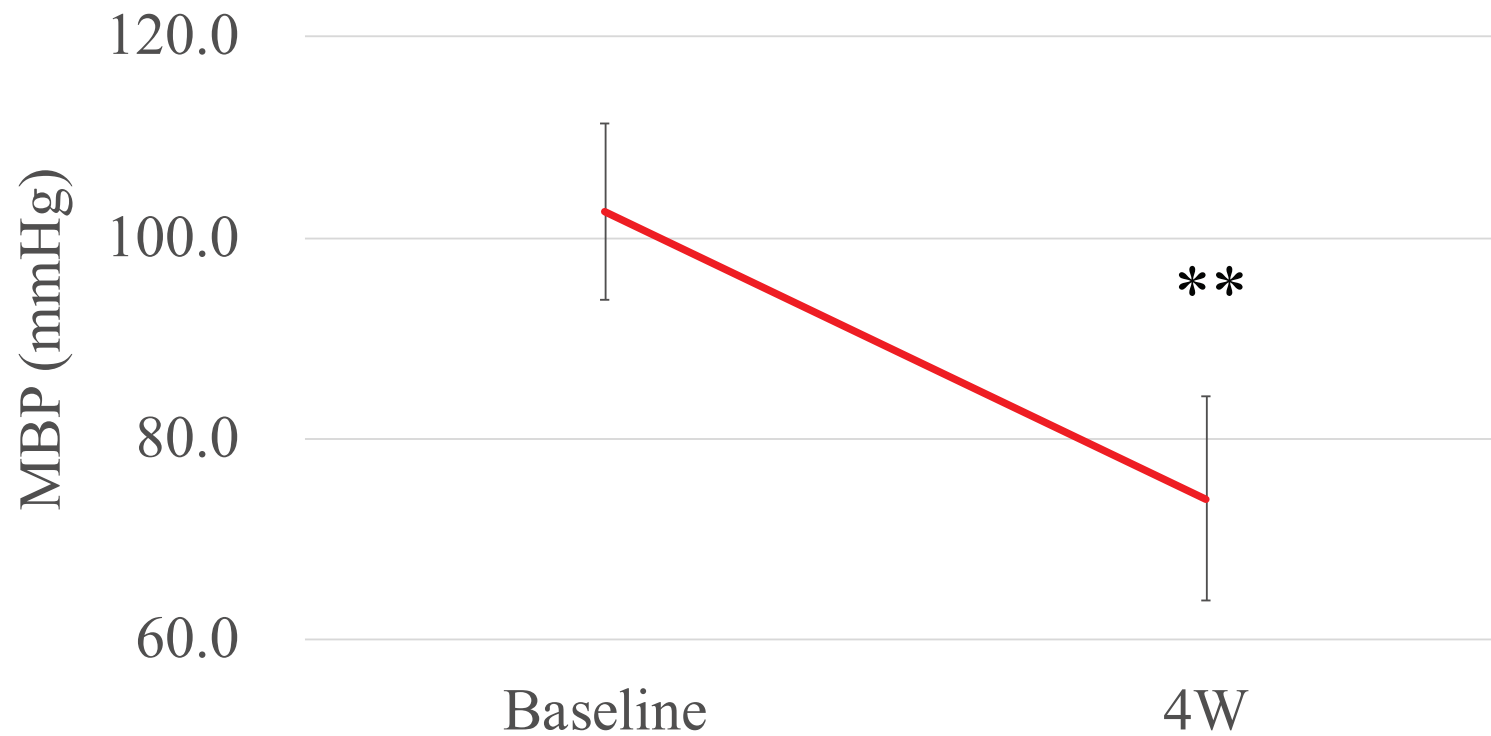


Fig. 2-5. 平均血圧（MBP）の経時的変化

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において MBP の有意な低下が認められた。

\*\*；  $p < 0.01$  vs. Baseline

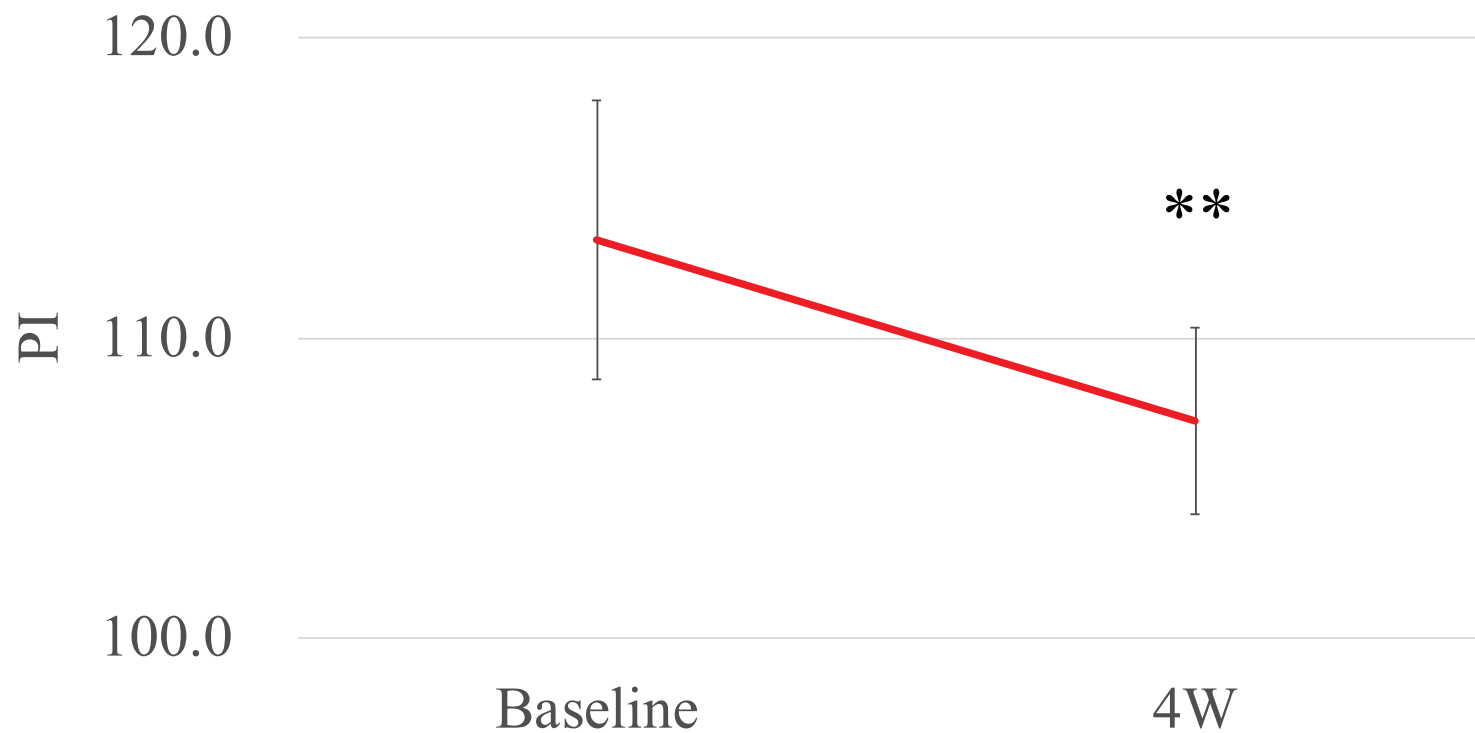


Fig. 2-6. 造影超音波検査により測定した最高輝度増加率（PI）の経時的变化

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において PI の有意な低下が認められた。

\*\*；  $p < 0.01$  vs. Baseline

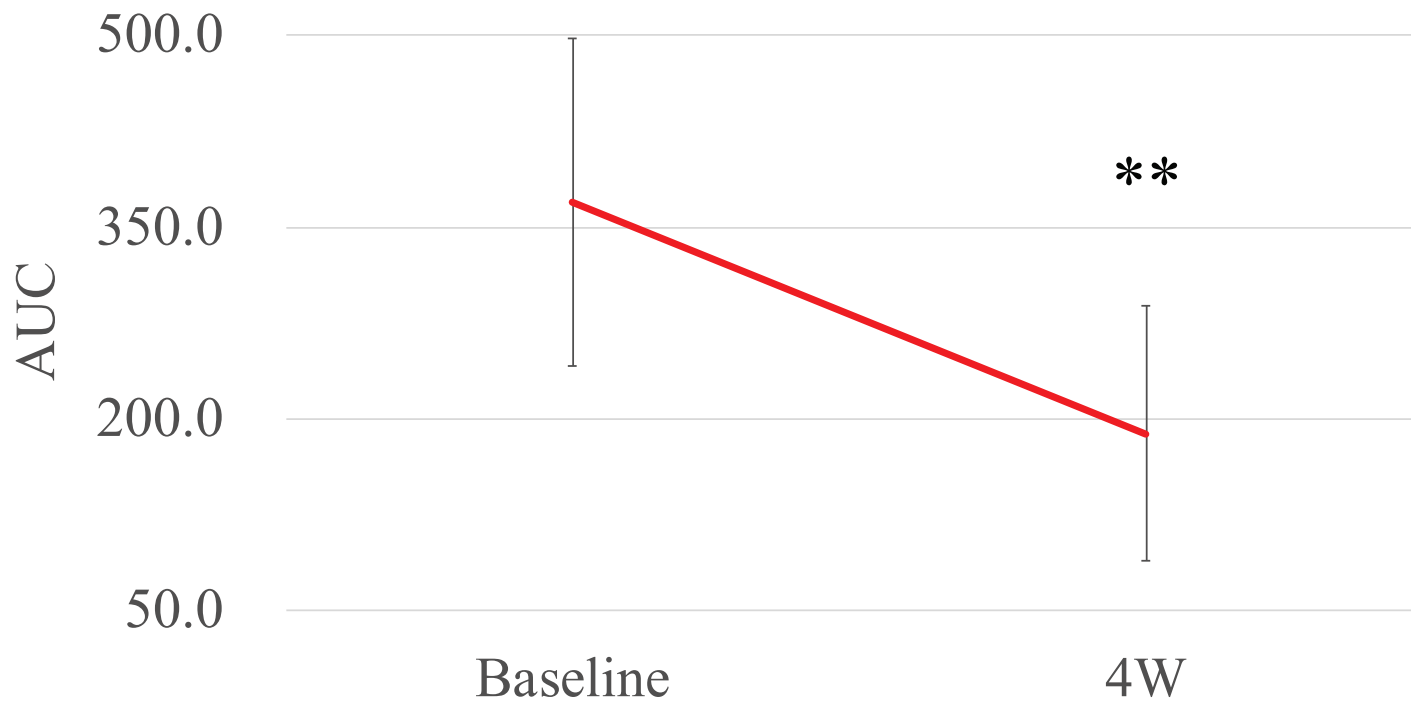


Fig. 2-7. 造影超音波検査により測定した曲線下面積（AUC）の経時的変化  
測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline と比較して、4W において AUC の有意な低下が認められた。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において  
AUC の有意な低下が認められた。

\*\*；  $p < 0.01$  vs. Baseline

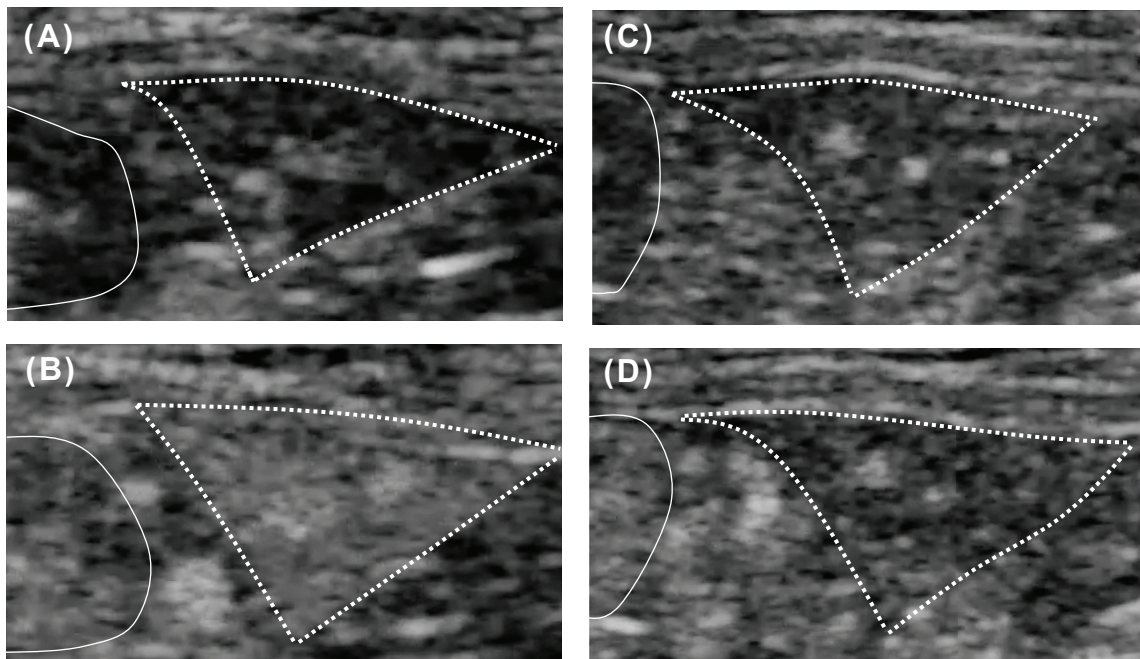


Fig. 2-8. 造影超音波検査における画像変化

(A)、(B) は高頻度心室開始前 (Baseline) における造影剤投与後の経時的変化を示す (A; 投与直後、B; 最も輝度が上昇した時間)。

(C)、(D) は高頻度刺激開始 4 週間目 (4W) における造影剤投与後の経時的変化を示す (D; 投与直後、E; 最も輝度が上昇した時間)。

Baseline においては、輝度の上昇が認められることに対し、4W においては輝度の上昇が軽度であった。

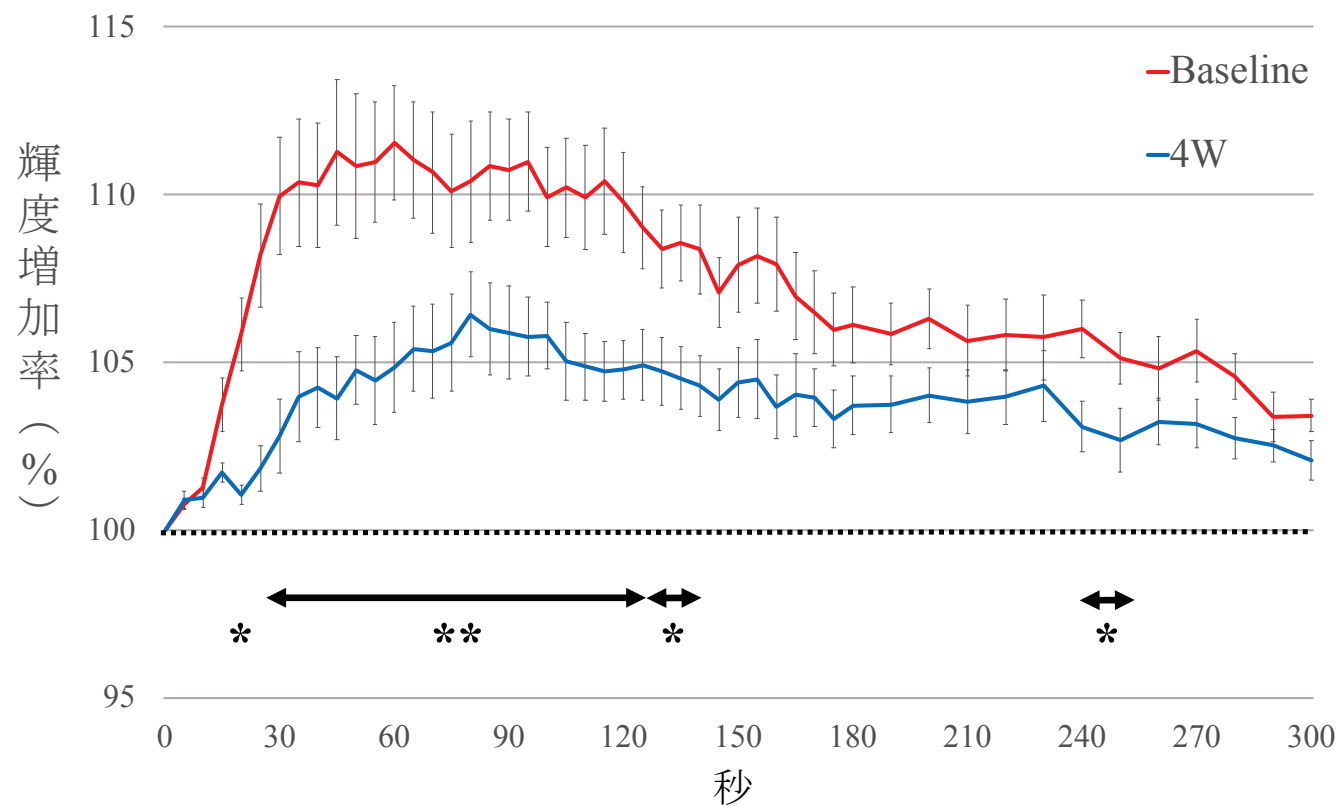


Fig. 2-9. 造影超音波検査において作出した輝度増加率—時間曲線

造影剤投与前の輝度を 100% (点線) と定義した。各時点での輝度増加率は、平均値±標準誤差で示す。ソナゾイド®静注後 20 秒から 140 秒における各時間、240 秒、および 250 秒における輝度増加率は、高頻度心室刺激前 (Baseline) と比較し、高頻度刺激開始 4 週間目 (4W) において有意に低下した。

\*;  $p < 0.05$  vs. Baseline, \*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

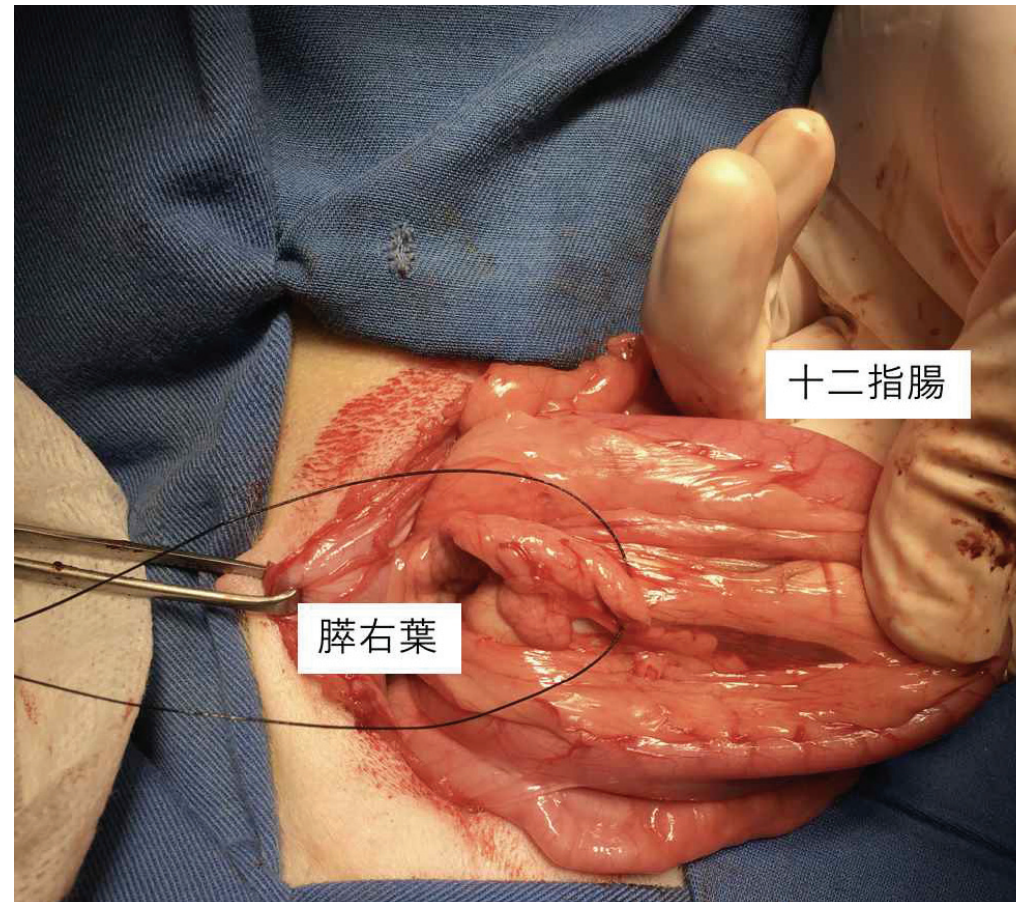


Fig. 2-10. 脾臓部分切除術による脾臓組織のサンプリング  
高頻度心室刺激前における脾臓のサンプリングは、ペースメーカー埋め込み手術時に、全身麻酔下において開腹下において行なった。



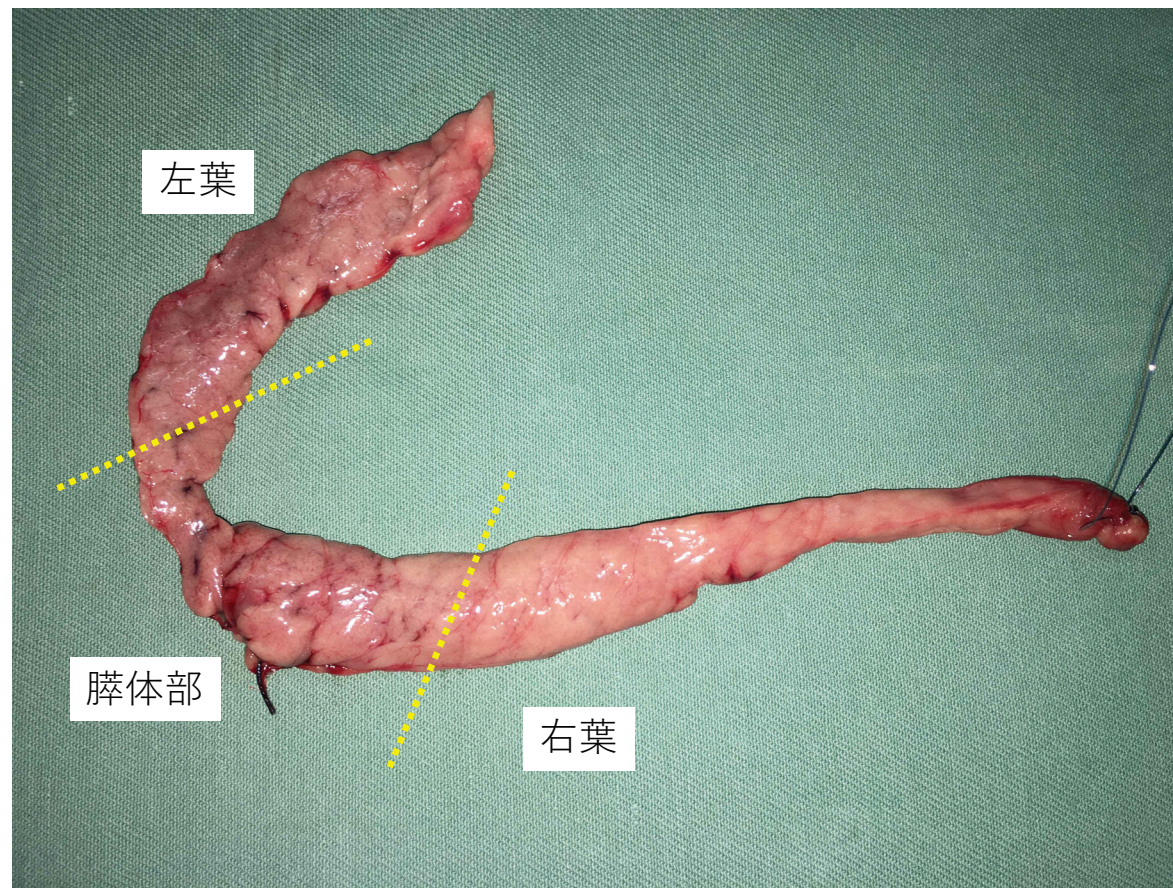


Fig. 2-11. 膈臓標本の切り出し部位  
高頻度刺激 4 週間目では右葉、左葉、膈体部および高頻度心室刺激前における  
サンプリング部位をそれぞれ切り出し、膈臓の全領域を評価した。



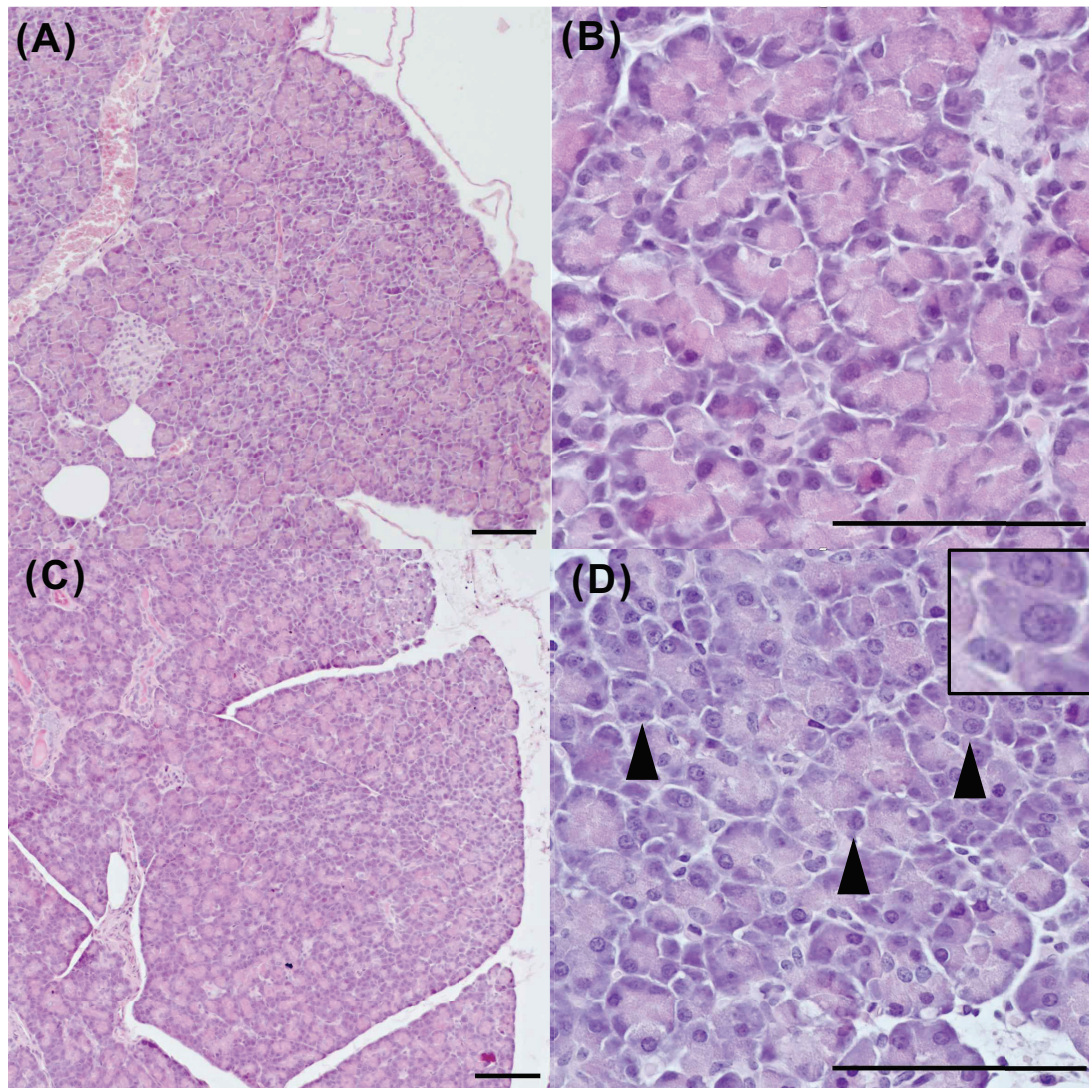


Fig. 2-12. 膵臓の病理組織学的変化

(A) (B)

高頻度心室刺激前 (Baseline)。膵腺房細胞質内に好酸性のチモーゲン顆粒が見られた。

(C) (D)

高頻度刺激開始 4 週間目 (4W)。4W では、Baseline と比較し、酵素原顆粒の減少を特徴とする膵腺房細胞の萎縮が認められた (arrow head)。

Bars=100  $\mu$  m 。

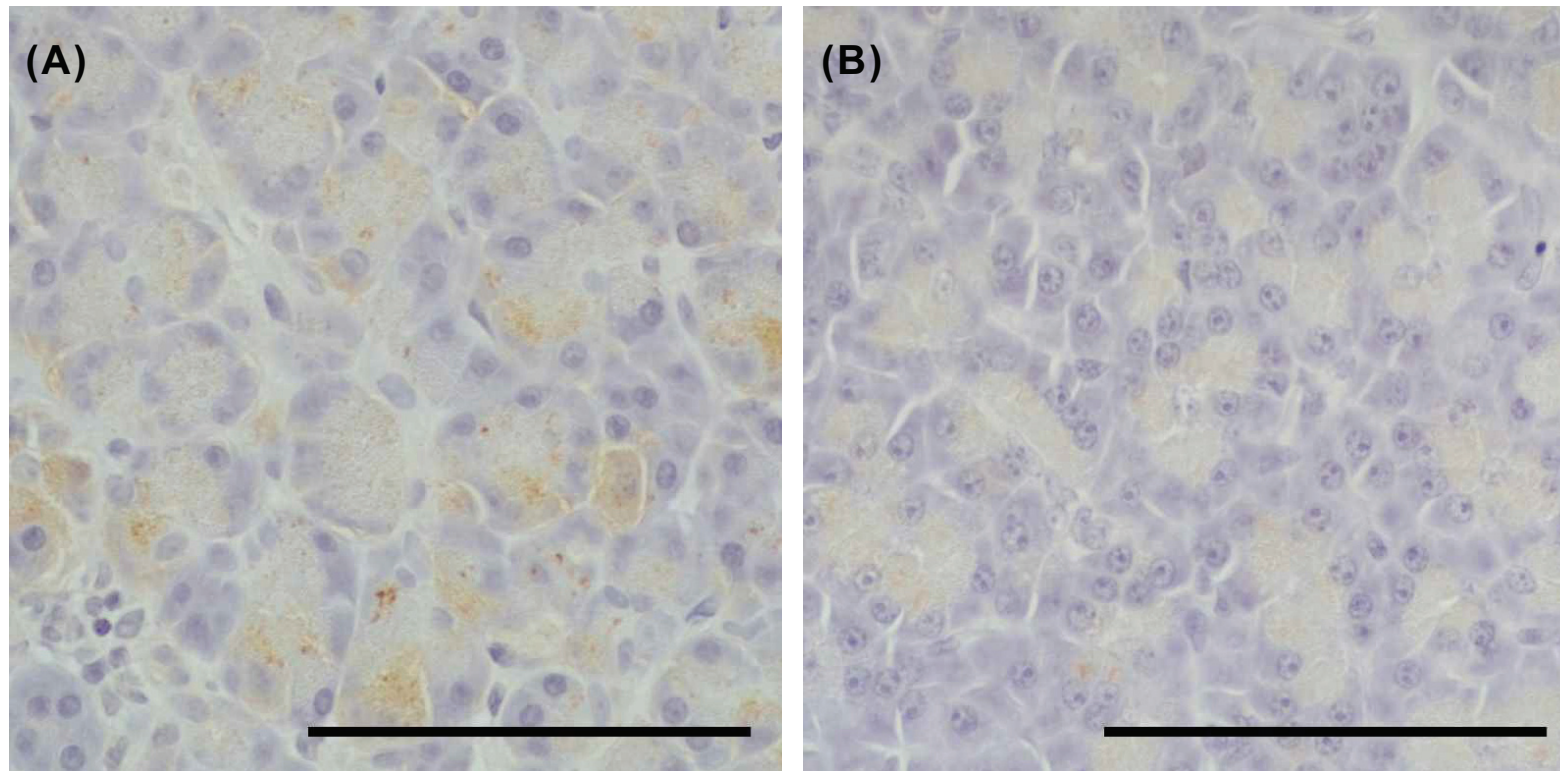


Fig. 2-13. 膵臓の免疫組織化学的变化

(A) 高頻度心室刺激前 (Baseline)。膵腺房細胞内のチモーゲン顆粒領域内において、トリプシノーゲン陽性反応が認められた。

(B) 高頻度頻度刺激開始 4 週間目。Baseline と比較し、トリプシノーゲン陽性反応の減弱傾向が認められた。

Bars=100  $\mu$  m

Table. 2-1. 心臓超音波測定値の経時的変化

Parameter	Baseline			4W			
HR (bpm)	107	±	14	142	±	23	*
LA/Ao	1.3	±	0.1	1.9	±	0.2	**
LVIDd (mm)	31.1	±	2.8	40.3	±	3.1	**
LVIDs (mm)	19.2	±	2.7	36.0	±	2.3	**
FS (%)	38.5	±	5.2	10.7	±	2.3	**
PEP/ET	0.3	±	0.0	0.6	±	0.0	**
SV (ml)	18.8	±	2.9	10.9	±	2.3	**
CO (l/min)	2.1	±	0.2	1.5	±	0.3	*
CI (l/min/m <sup>2</sup> )	4.4	±	0.5	3.2	±	0.8	**

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,  
 HR; 心拍数, LA/Ao; 左心房－大動脈径比, LVIDd; 拡張末期左心室内径,  
 LVIDs; 収縮末期左心室内径, FS; 左心室内径短縮率,  
 PEP/ET; 前駆出時間－駆出時間比, SV; 左心室 1 回拍出量,  
 CO; 心拍出量, CI; 心係数,

\*;  $p < 0.05$  vs. Baseline; \*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

Table. 2-2. 血圧測定値の経時的変化

Parameter	Baseline			4W			
SBP (mmHg)	151.2	±	20.2	105.0	±	11.8	**
MBP (mmHg)	102.7	±	8.8	74.0	±	10.2	**
DBP (mmHg)	80.2	±	6.8	58.6	±	10.4	**

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, SBP; 収縮期血圧, MBP; 平均血圧, DBP; 拡張期血圧,

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

Table. 2-3. 中心静脈圧が Baseline においては 5 mmHg、4W においては 5, 10 あるいは 15 mmHg であると仮定した場合の体血管抵抗

	mmHg	Period					
		baseline			4W		
	5	3,712	±	606	3,890	±	1,389
SVR (dynes×sec×cm <sup>-5</sup> )	10				3,613	±	1,321
	15				3,336	±	1,253

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, SVR; 体血管抵抗



Table. 2-4. 造影超音波測定値の経時的変化

Parameter	Baseline			4W		
PI (%)	113.3	±	4.6	107.3	±	3.1 **
AUC	369.7	±	129.0	188.7	±	99.7 **
TP (sec)	55.7	±	18.4	104.4	±	32.5 **
TTU (sec)	19.3	±	5.0	33.6	±	16.8
TTW (sec)	232.9	±	57.3	227.9	±	55.3

各測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, PI; 最高輝度増加率, AUC; 曲線下面積, TP; ピーク到達時間, TTU; 初期上昇時間, TTW; ウォッシュアウト時間, \*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline

Table. 2-5. 膵臓における病理所見スコアの経時的変化

	Baseline			4W			
Score	2.7	±	0.0	1.3	±	0.0	**

各スコアは平均値 ± 標準誤差で示す。

チモーゲン顆粒を含む膵腺房細胞が全体の 5%未満である場合は「0」、5-25%である場合は「1」、25-50%である場合は「2」、51%以上である場合は「3」とスコアリングした。ベースラインにおいては、膵臓部分切除術により、右葉あるいは左葉から膵臓組織をサンプリングした。4W においては、右葉、左葉および膵体部における各部位をスコアリングし、その平均値を採用した。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline



Table. 2-6. 血清犬心臓特異的リパーゼ免疫活性濃度の経時的変化

Parameter	Baseline			4W		
cPLI ( $\mu\text{g/l}$ )	31.4	$\pm$	3.5	54.0	$\pm$	30.3

測定値は平均値  $\pm$  標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

cPLI; 犬心臓特異的リパーゼ免疫活性

### 第 3 章

心機能改善薬投与による高頻度心室刺激犬の  
膀胱の血流量ならびに形態的变化の評価

## 1. 緒言

第2章では、4週間のRVPを与え作製した低心拍出性心不全モデル犬において、腓臓血流量の低下が認められ、さらには腓腺房細胞の萎縮という腓臓組織の病理学的変化が引き起こされることが明らかとなった。そして、この腓臓血流量の低下は、COの低下に基づくMBPの低下により引き起こされたものであると考えられた。しかしながら、RVP犬において腓腺房細胞萎縮が引き起こされた機序は明らかとなっておらず、腓臓血流量の減少との因果関係は不明である。そのため、RVPによるCOの低下に続く腓臓血流量の低下を軽減することができれば、その供試動物の腓臓に対し病理組織学的検査を行うことにより、腓臓血流量の低下と腓腺房細胞萎縮との関連性をより明確にできると考えた。

COを増加させる手段の一つに心収縮力の増強が挙げられる[89]。心筋収縮性の調節には、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化が中心的な役割を担っている[89,90]。収縮タンパク活性化は心筋トロポニンCへの $\text{Ca}^{2+}$ 結合によりトリガーされ、その $\text{Ca}^{2+}$ 結合量は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存して起こるとされている[89]。そのため、心筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 量または濃度を増加させる強心配糖体、キサンチン誘導体およびカテコールアミン類などは、いわゆる強心薬として薬理作用を発揮することになる[89,91,92]。しかしながら、これら薬剤は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷による催不整脈作用ならびに心筋細胞傷害などを起こす危険性を併せ持つことから[89]、これらに代わる新しい心不全治療薬の登場が待たれていた[89]。

近年、犬の心不全治療において、カルシウムセンシタイザーであるピモベンダンが、臨床現場において広く使用されている[93-99]。ピモベンダンは、従来の薬剤とは異なり、心筋トロポニンCの $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を増強することにより陽性変力作用を発揮する[89,100]。これにより、HRを増加させることな

く CO を増加させることが可能となる [101,102]。また、ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase; PDE) III を阻害することにより血管平滑筋を弛緩させるが、CO 増加により血圧は維持されることになる [102]。これまでに、ピモベンダンは、実験的に作出された MMVD 犬において腎血流量を改善させる効果を有することが証明されている [103]。そのため、膀胱血流量の低下が引き起こされた RVP 犬において、ピモベンダンの投与によりその低下を軽減することができるのではないかと考えた。

本章では、第 1 章ならびに第 2 章と同様にして作製した RVP 犬に対し、CO 増加作用を期待してピモベンダンを投与し、心機能ならびに膀胱血流量の変化、さらには膀胱房細胞の病理組織学的変化を併せて評価した。そして、膀胱血流量および膀胱房細胞の形態的变化の関連性をより明確にすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規程に準拠し遂行した。(承認番号：第31-2)

### 2-2. 供試動物

第1章ならびに第2章と同様に、全身状態に問題がないと判断した実験用ビーグル10頭を供試した。性別は雄5頭、雌5頭、年齢は2～3歳、体重は9.3～11.2 kg（中央値：9.7 kg）であった。供試動物の飼養環境は第1章ならびに第2章と同様とした。

### 2-3. 実験犬の作出

前述のビーグル犬10頭を無作為に2群に分け、それぞれ第1章ならびに第2章と同様の方法を用いて、右心室心外膜に心室刺激電極リードを縫着した。14日間の術後養生期間の後、心室刺激電極リードと体外式ペースメーカーを接続し、RVPを開始した。第1章と同様に、RVPの設定は、4V、260回/分、4週間とした。

1つの群には、ピモベンダン(ピモベハート<sup>®</sup>、共立製薬、東京、日本)を、犬の僧帽弁閉鎖不全による慢性心不全に伴う症状改善に対する一般使用量0.25 mg/kg BIDにて投与（5頭）した[98,104,105]。薬剤は午前8時と午後4時に経口投与した。そして、無投薬とした群をコントロール群、ピモベンダンを投与した群をピモベンダン群とした。

### 2-4. 実験プロトコール

第2章と同様に、RVPの開始前（Baseline）、4週間目（4W）を測定ピリ

オドとして、以下の各種検査を実施した。また、各種検査は、第 1 章ならびに第 2 章と同様の条件下において実施した。

#### 2-4.1 心臓超音波検査

第 1 章ならびに第 2 章と同様の方法を用いて、心臓超音波検査により心機能を評価した。

右傍胸骨左室短軸断面像心基部レベルの B モードにおいては LA/Ao を、腱索レベルの M モードにおいては、LVIDd、LVIDs、および FS を計測した。

左傍胸骨心尖部五腔断面のドプラモードにおいては、大動脈弁口部波形から SV、CO ならびに PEP/ET を計測した。また、第 1 章ならびに第 2 章と同様に、CO に対する個体間の体格差の影響を是正した値である CI を算出した。

#### 2-4.2 血圧測定

第 1 章ならびに第 2 章と同様の方法を用いて、オシロメトリック法により血圧測定を行なった。

SBP、MBP および DBP を 3 回以上繰り返し計測し、得られた値の誤差が 3 mmHg 以内である場合に、3 回の平均値を測定値として採用した。

また、第 1 章と同様に、Baseline において CVP を 5 mmHg、4W において 5 mmHg、10 mmHg、あるいは 15 mmHg と仮定し、SVR を算出した。

#### 2-4.3 造影超音波検査

第 2 章と同様の方法を用いて、造影超音波検査により脾臓血流量の測定を行なった。超音波造影剤であるソナゾイド®を静脈内投与後、0 秒から 300 秒までの脾右葉の輝度変化を超音波装置のハードディスクに動画保存した。その動画を基に、脾実質に設定した 3 箇所 ROI から継時的な輝度変化を測定

し、TIC を作出した。そして、作出した TIC から、血流指標パラメーターである PI、AUC、TP、TTU および TTW を算出した。

また、ソナゾイド®投与後各時点において、Baseline の輝度増加率をそれぞれ 100%と定義し、4 週間の RVP によるこれら値の変化率を時点ごとに算出した。

#### 2-4.4 膵臓組織のサンプリング

膵臓組織のサンプリングは、第 2 章と同様の方法を用いて行った。Baseline においては、ペースメーカー埋め込み手術時に開腹も行い、膵右葉あるいは膵左葉から 1cm 程の膵臓組織片をサンプリングした。4W においては、安楽死後に膵臓全体を摘出した。Baseline ならびに 4 W においてサンプリングした膵臓組織は、10%中性緩衝ホルマリン液により固定した。

#### 2-4.5 病理組織学的検査

第2章と同様に、Baselineならびに4Wにおける膵臓組織からHE染色標本作製し、光学顕微鏡を用いて病理組織学的に評価した。Baselineでは部分切除した膵臓組織片を評価した。4Wでは右葉、左葉、膵体部およびBaselineのサンプリングにおける結紮/切断面をそれぞれ切り出し、膵臓の全領域を評価した。

また、第 2 章と同様に、チモーゲン顆粒を含む膵腺房細胞が全体の 5%未満である場合は「0」、5-25%である場合は「1」、25-50%である場合は「2」、51%以上である場合は「3」とグレード分類し、病理組織学的検査の半定量的評価を行った。4Wにおいては、右葉、左葉および膵体部における各部位をスコアリングし、その平均値を採用した。

#### 2-4.6 免疫組織化学検査

第2章と同様に、アンチトリプシン抗体を用いて、Baselineならびに4Wにおけるチモーゲン顆粒内のトリプシノーゲンの含有程度を評価した。

## 2-5. 統計手法

得られた各データが正規分布している否かを Shapiro-Wilk test により評価した。造影超音波検査における各時点の輝度増加率の変化率ならびに病理組織学的検査におけるスコアは、平均値±標準誤差として示した。また、他の全てのデータは、平均値±標準偏差として示した。心臓超音波検査、血圧測定、輝度増加率の変化率以外の造影超音波検査の各データ、および病理組織学的検査における各スコアは、群内においては paired t-test あるいは Wilcoxon signed-rank test、群間においては unpaired t-test あるいは Mann-Whitney U-test を使用して、比較を行った。各時点における輝度増加率の変化率に関しては、Friedman Test with post hoc Mann-Whitney U-test を使用して、コントロール群ならびにピモベンダン群における群間比較を行った。

統計解析はパソコン用ソフトウェア（BellCurve for Excel, 株式会社社会情報サービス, 東京, 日本）を用いて行い、いずれも  $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。



### 3. 結果

#### 3-1. 心臓超音波検査

FS は、両群において、Baseline と比較して 4W の値は有意に低値であった（両群において  $p<0.01$ ）。しかしながら、ピモベンダン群における 4W の FS は、コントロール群のそれと比較して有意に高値であった（ $p<0.01$ ）（Fig. 3-1.）。SV、CO および CI は、ピモベンダン群において、Baseline と比較して 4W の値に有意な変化は認められなかった。一方、コントロール群においては、Baseline と比較して 4W の値は有意に低値であった（SV;  $p<0.01$ , CO, CI;  $p<0.05$ ）（Fig. 3-2.）。さらに、ピモベンダン群における 4W の CO ならびに CI は、コントロール群のそれと比較して有意に高値であった（いずれも  $p<0.05$ ）。LA/Ao、LVIDd、LVIDs および PEP/ET は、両群において、Baseline と比較して 4W の値は有意に高値であった（いずれも両群において  $p<0.01$ ）。しかしながら、ピモベンダン群における 4W の PEP/ET は、コントロール群のそれと比較して有意に低値であった（ $p<0.05$ ）。HR は、ピモベンダン群においては、Baseline と比較して 4W の値に有意な変化は認められなかった。一方、コントロール群においては、Baseline と比較して 4W の値は有意に高値であった（ $p<0.05$ ）（Table. 3-1.）。

#### 3-2. 血圧測定

SBP ならびに MBP は、ピモベンダン群において、Baseline と比較して 4W の値に有意な変化は認められなかった。一方、コントロール群においては、Baseline と比較して 4W の値は有意に低値であった（SBP;  $p<0.01$ , MBP;  $p<0.05$ ）。さらに、ピモベンダン群における 4W の SBP ならびに MBP は、コントロール群のそれと比較して有意に高値であった（SBP;  $p<0.01$ , MBP;  $p<0.05$ ）（Fig. 3-3.）。DBP は、群内ならびに群間において有意な差は認めら

れなかった (Table. 3-2.)。SVR は、ピモベンダン群では、Baseline の CVP 値を 5 mmHg、4W では 5 mmHg、10 mmHg あるいは 15 mmHg と仮定した場合において、Baseline と比較して有意差は認められなかった。しかしながら、4W の CVP 値を 10 mmHg あるいは 15 mmHg と仮定した場合においては、その値に低下傾向が認められた (10 mmHg;  $p=0.097$ , 15 mmHg;  $p=0.058$ )。また、コントロール群では、CVP 値のいずれの組み合わせにおいても、Baseline と比較して、4W の値に有意な変化は認められなかった (Table. 3-3.)。

### 3-3. 造影超音波検査

PI ならびに AUC は、ピモベンダン群においては、Baseline と比較して 4W の値に有意な変化は認められなかった。対照的に、コントロール群においては、Baseline と比較して 4W の値は有意に低値であった (いずれも  $p<0.05$ ) (Fig. 3-4, 5.)。それにより、ピモベンダン群における 4W の AUC ならびに PI は、コントロール群のそれと比較して有意に高値であった (いずれも  $p<0.05$ )。TP は、ピモベンダン群において、Baseline と比較して 4W の値に有意な変化は認められなかった。対照的に、コントロール群においては、Baseline と比較して 4W の値は有意に高値であった ( $p<0.05$ )。TTU ならびに TTW は、群内ならびに群間において有意な差は認められなかった (Table. 3-4.)。さらに、ピモベンダン群における輝度増加率の変化率は、ソナゾイド<sup>®</sup>投与後のほぼ全て時点において、コントロール群におけるそれよりも有意に高値であった (145 から 160 秒および 280 秒;  $p<0.05$ , それ以外の時間;  $p<0.01$ ) (Fig. 3-6, 7.)。

### 3-4. 病理組織学的検査

Baseline では、両群ともにサンプリングの際に結紮/切断した箇所を含め、

病理組織学的な異常所見は認められなかった。

ピモベンダン群の 4W において、5 頭全てにおいて病理組織学的な異常所見は認められなかった (Fig. 3-8.) (Table. 3-5.)。対照的に、コントロール群の 4W においては、Baseline と比較して、5 頭全てにおいてチモーゲン顆粒の減少を伴う膵腺房細胞の萎縮が認められた ( $p < 0.01$ )。これは、右葉、左葉および膵体部の各部位において認められた。また、病変の程度に関して、各部位における差はなかった。毛細血管の拡張、血液成分の漏出ならびに間隙の拡大をはじめとしたうっ血所見は認められなかった (Fig. 3-8.) (Table. 3-5.)。Baseline で結紮/切断した箇所においても、膵腺房細胞の萎縮以外の異常所見は認められなかった。また、その病変の程度も同様なものであった。

### 3-5. 免疫組織化学検査

両群ともに Baseline では、HE 染色にて確認された膵腺房細胞内のチモーゲン顆粒領域内において、トリプシノーゲン陽性反応が認められた。

ピモベンダン群の 4W では、トリプシノーゲン陽性反応に関して変化は認められなかった。対照的に、コントロール群の 4W においては、5 頭全てにおいてトリプシノーゲン陽性反応の減弱が認められた (Fig. 3-9.)。

#### 4. 考察

第2章では、RVP犬において、COの低下により腭臓血流量の減少が引き起こされることを明らかとした。そして、腭臓血流量の減少は、チモーゲン顆粒の減少を伴う腭腺房細胞の萎縮という病理組織学的変化を引き起こすことも明らかにした。本章では、腭臓血流量の低下と腭腺房細胞の萎縮との因果関係をより明確化することを目的とし、COを増加させる薬剤を投与し、無投薬時に認められた腭臓血流量の低下が軽減されるか否か検討した。そして、その際の腭腺房細胞の病理組織学的変化も併せて評価した。

COを増加させる薬剤の一つとして、ピモベンダンが知られている。ピモベンダンは、犬のMMVDやDCMに起因した心不全時の血行動態を改善し、QOLの改善ならびに予後の延長効果を示すことが明らかとなっている[94-97]。そして、これらピモベンダンの血行動態の改善効果は、主にその陽性変力作用によりもたらされ则认为られている[102]。

今回、心臓超音波検査において、ピモベンダン投与により、無投薬のRVP犬において認められた、左心室収縮力の低下を表すFSの低下ならびにPEP/ETの増加という変化は有意に軽減された。また、コントロール群で認められたSVならびにCOの低下も抑制された。これらの結果は、本研究の供試動物に対し、ピモベンダンの陽性変力作用が効果的に発揮されたことを示し、それに起因することで、CO増加作用が認められたものと考えられる。さらにHRに関しては、ピモベンダン投与によりコントロール群において認められたその増加が抑制された。この理由として、ピモベンダンは、HR増加に依存せずに、SVを増加させることでCOを増加させることが知られている[101,102]。今回の供試動物においても、これに合致した結果が得られたものと考えられる。さらに、COが維持されたことにより、HRの増加という代償反応の亢進が引き起こされなかったものとも考えられる。

ピモベンダンは PDE III 阻害作用により血管平滑筋を弛緩させる [89,106,107]。このことにより、末梢血管の拡張をきたし、SVR を低下させる [101,102]。しかしながら、今回、ピモベンダン投与において、陽性変力作用が十分に発揮されたのに対し、末梢血管拡張作用に関しては、その傾向は認められたものの明確な効果が示されなかった。Verdouw らは、全身麻酔をかけた健常ブタにおいて、さまざまな用量のピモベンダンを低用量から段階的に投与していき、陽性変力作用と末梢血管拡張作用のバランスの変化を検討している [108]。その結果、ピモベンダンはまず陽性変力作用を発揮し、その後用量が増加するにつれて末梢血管拡張作用が現れてくることを明らかにした。そのため、今回、使用したピモベンダンの用量は、供試動物に対しては、陽性変力作用を発揮したものの、明確な末梢血管の拡張を認めるまでには至らなかった可能性が推測される。

本章における脾臓血流量の測定は、第 2 章と同様に造影超音波検査を使用した。その結果、ピモベンダン投与により、第 2 章と同様にコントロール群で認められた、MB の流入量、すなわち臓器における血流量を反映するとされる PI ならびに AUC の低下が抑制された。これらは、ピモベンダンにより観察時間内における脾臓血流量が維持されたことを示している。これは、ソナゾイド®投与後ほぼすべての時点において、ピモベンダン群における輝度増加率の低下が軽減されていたことから明らかであった。また、血圧測定値に関しても、ピモベンダンの投与により、コントロール群で認められた SBP ならびに臓器血流量を規定する因子である MBP の低下が軽減された。これらのことから、ピモベンダンによる脾臓血流量の維持は、心ポンプ機能の維持により CO の低下が抑制されたことによるものと判断した。

病理組織学的検査において、CO ならびに脾臓血流量が維持されたピモベンダン群では、脾腺房細胞を含む脾臓組織において病理学的変化は認められなかった。一方、第 2 章と同様にコントロール群においては、脾臓の広範囲

にわたり、チモーゲン顆粒ならびにこれに含まれるトリプシノーゲンの減少を伴う膵腺房細胞の萎縮が認められた。このことから、膵臓血流量の低下が膵腺房細胞萎縮を直接的に引き起こした要因であると結論づけた。

本研究にはいくつかの制限事項が存在する。第 1 に、心臓に対し病理組織学的検査を行っていない点である。本研究では、ピモベンダンにより CO が維持された理由として、その陽性変力作用によるものとを推測した。しかしながら、これまでに、ピモベンダンは冠動脈を拡張することにより心筋灌流量を増加させる作用も有することが明らかとなっている[109]。RVP が心筋収縮機能の低下を引き起こす主要因の一つとして、高頻拍に起因する心筋虚血が挙げられる[50]。そのため、今回ピモベンダン投与により心機能低下が抑制された理由として、陽性変力作用に加え、冠動脈血流量の維持により心筋が保護されたためである可能性もある。よって、病理組織学的に心筋傷害の程度を評価することにより、CO が維持された機序をより明確にすることが可能であると考えられる。第 2 に、本研究に供した動物の数が少ないという問題が挙げられる。

以上のことにより、RVP 犬において、CO を増加させる薬剤としてピモベンダンを投与し、心機能の低下を抑制することにより、膵臓の血流量が維持されることが明らかとなった。そして、膵腺房細胞の萎縮という病理組織学的変化をも抑制することが可能となった。これら結果により、心機能低下に基づく膵臓血流量の低下が、膵腺房細胞萎縮を直接的に引き起こした要因であると結論づけた。

## 5. 小括

本章では、10頭のRVP犬を作出し、そのうち5頭にピモベンダン投与した。その結果、ピモベンダンによりCOが維持され、脾臓血流量においても維持された。さらに、ピモベンダンの投与により、コントロール群において認められたチモーゲン顆粒の減少を伴う脾腺房細胞の萎縮が抑制された。以上の結果から、COの低下により招来された脾臓血流量の低下が、脾腺房細胞の萎縮を引き起こした直接的要因であると結論づけた。

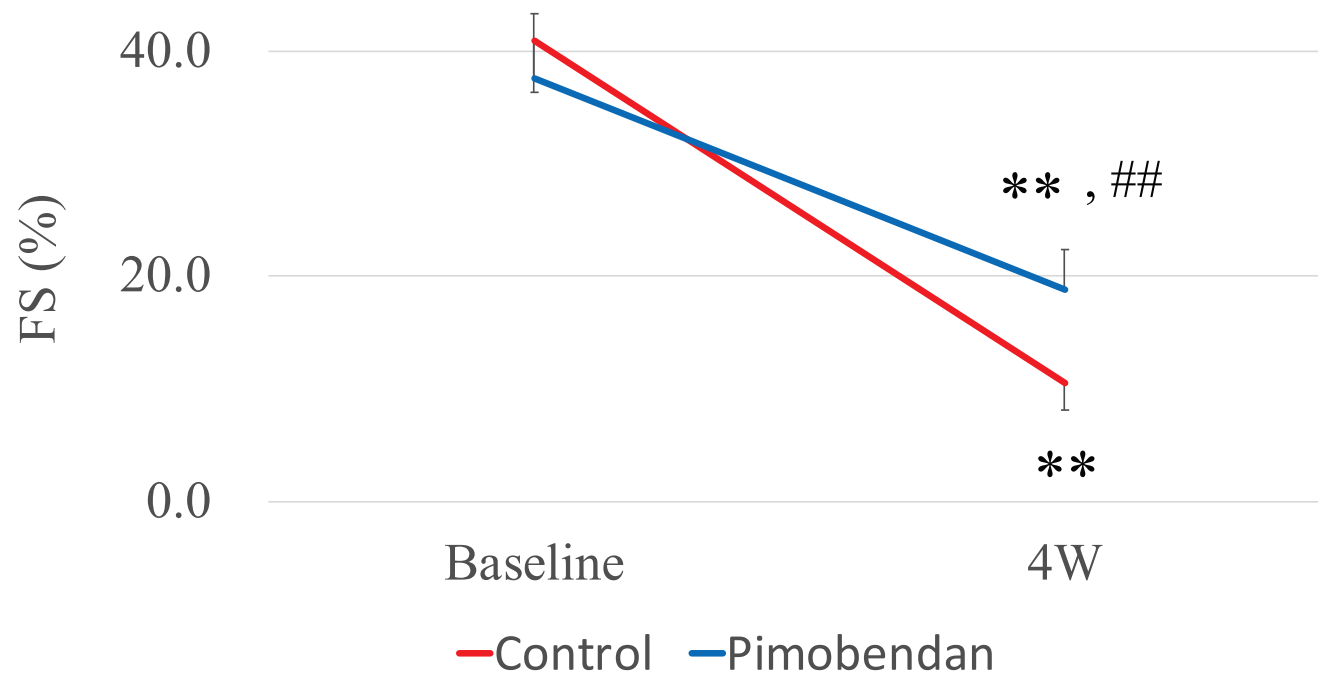


Fig. 3-1. コントロール群ならびにピモベンダン群における左心室内径短縮率（FS）の変化率

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

高頻度心室刺激前（Baseline）と比較して、高頻度刺激開始 4 週間目（4W）において、両群とも有意な FS の低下が認められた。しかしながら、ピモベンダン群における 4W の FS は、コントロール群のそれと比較して有意に高値であった。

Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Baseline, ##;  $p < 0.01$  vs. Control



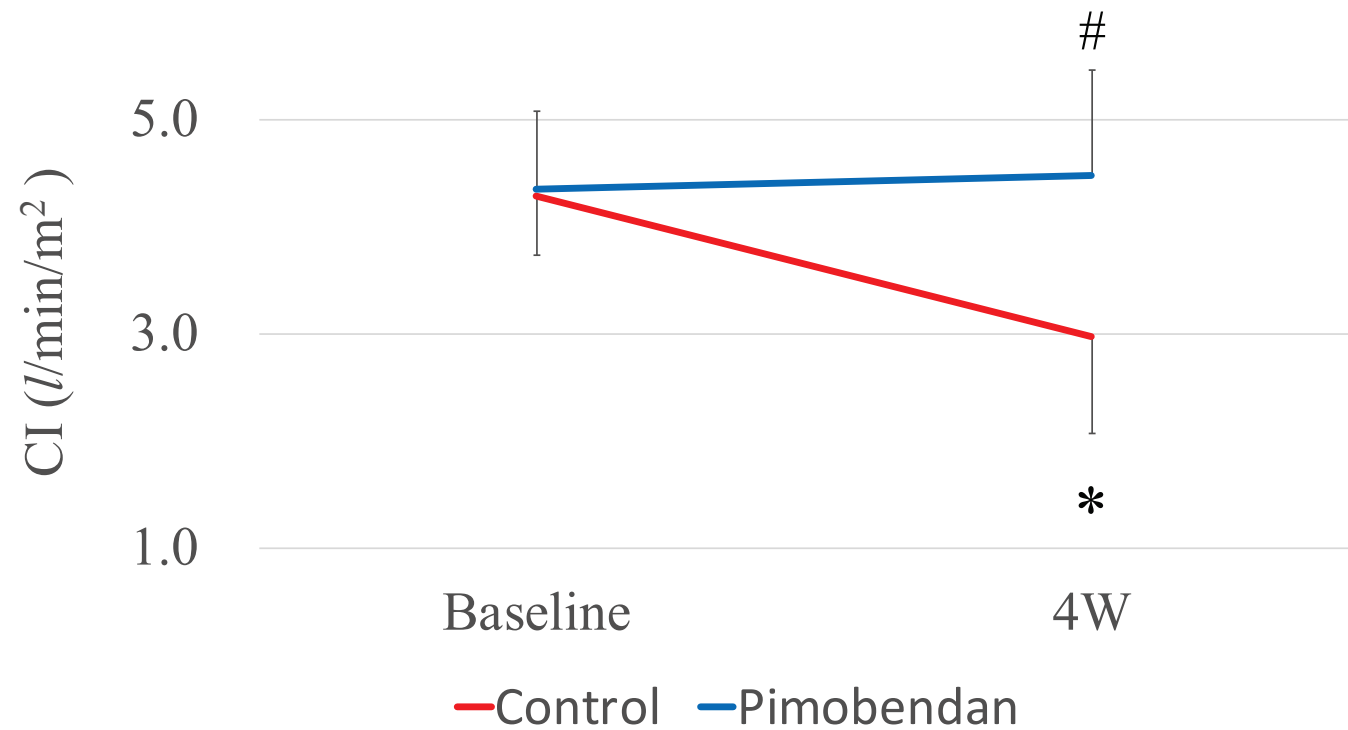


Fig. 3-2. コントロール群ならびにピモベンダン群における心係数（CI）の変化率

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

コントロール群において、有意な CI の低下が認められた。しかしながら、ピモベンダン群においては、その低下は認められなかった。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群, \*,  $p < 0.05$  vs. Baseline, #;  $p < 0.05$  vs. Control

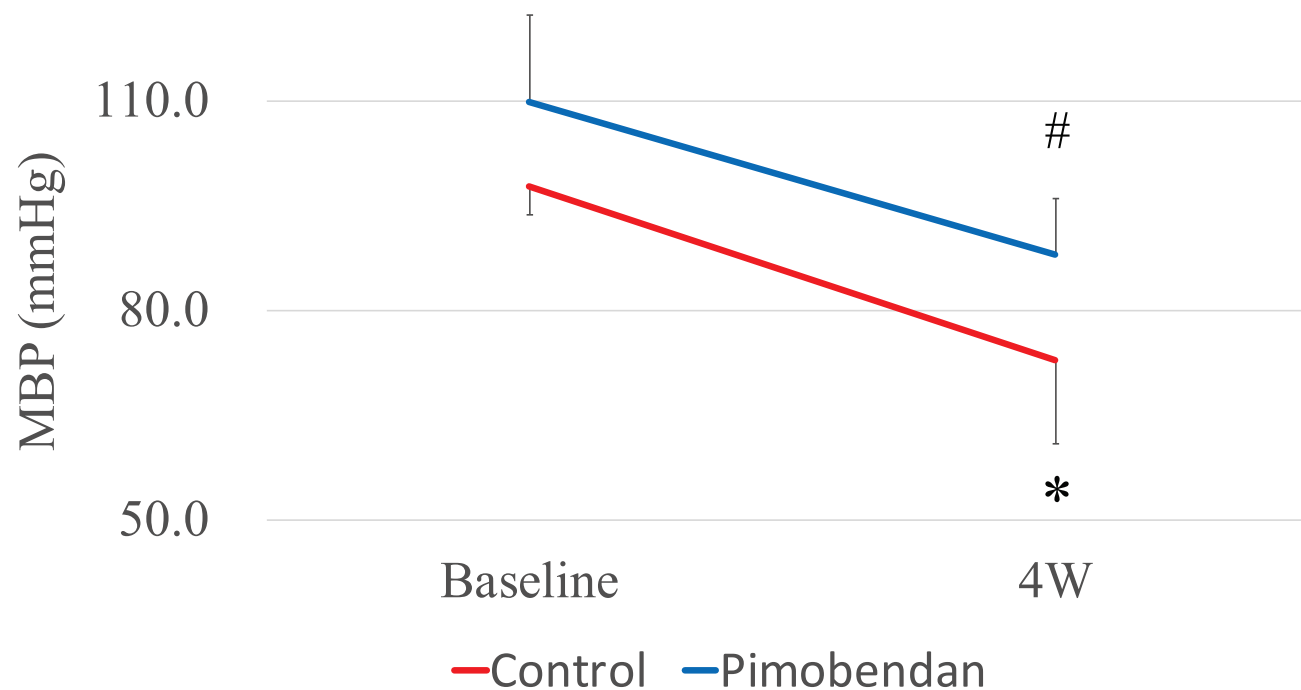


Fig. 3-3. コントロール群ならびにピモベンダン群における平均血圧（MBP）の変化率

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

コントロール群において、有意な MBP の低下が認められた。しかしながら、ピモベンダン群においては、その低下は認められなかった。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群, \*,  $p < 0.05$  vs. Baseline, #;  $p < 0.05$  vs. Control

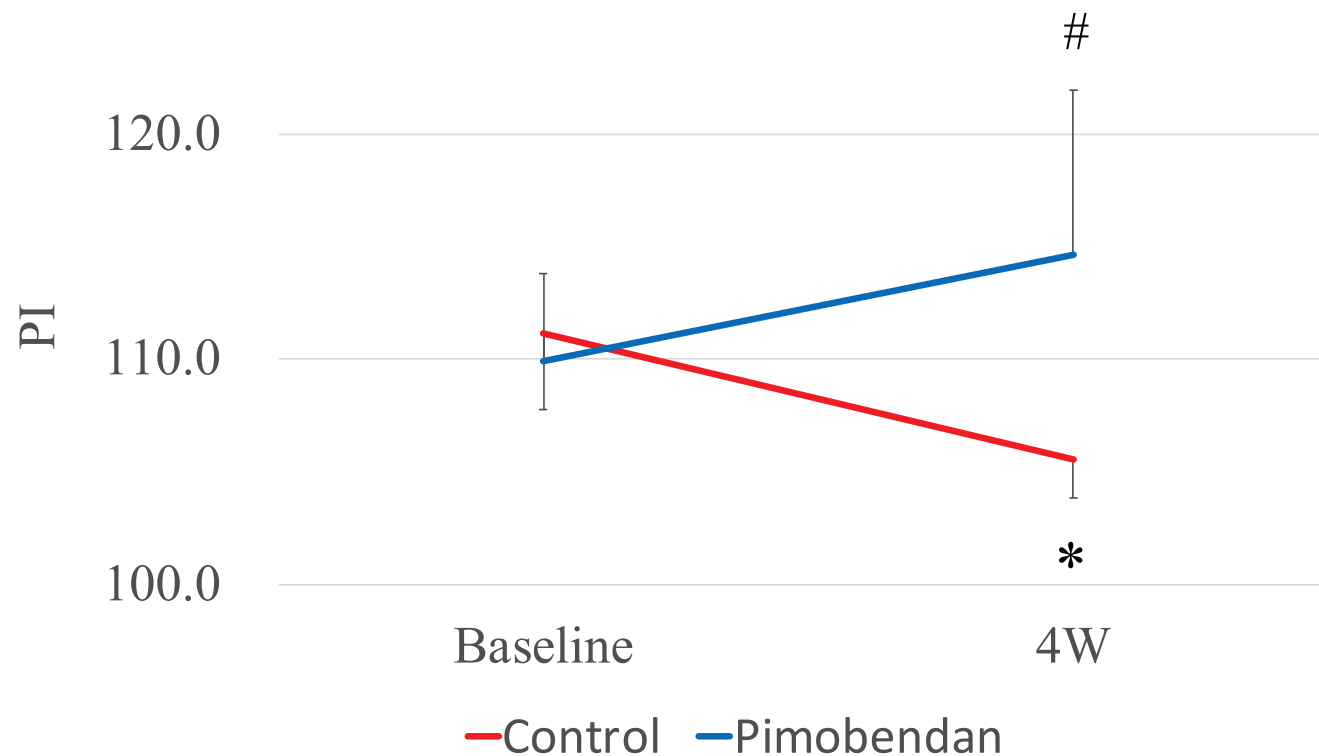


Fig. 3-4. コントロール群ならびにピモベンダン群における最高輝度増加率（PI）の変化率  
測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

コントロール群において、有意な PI の低下が認められた。しかしながら、ピモベンダン群においては、その低下は認められなかった。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群, \*,  $p < 0.05$  vs. Baseline, #;  $p < 0.05$  vs. Control

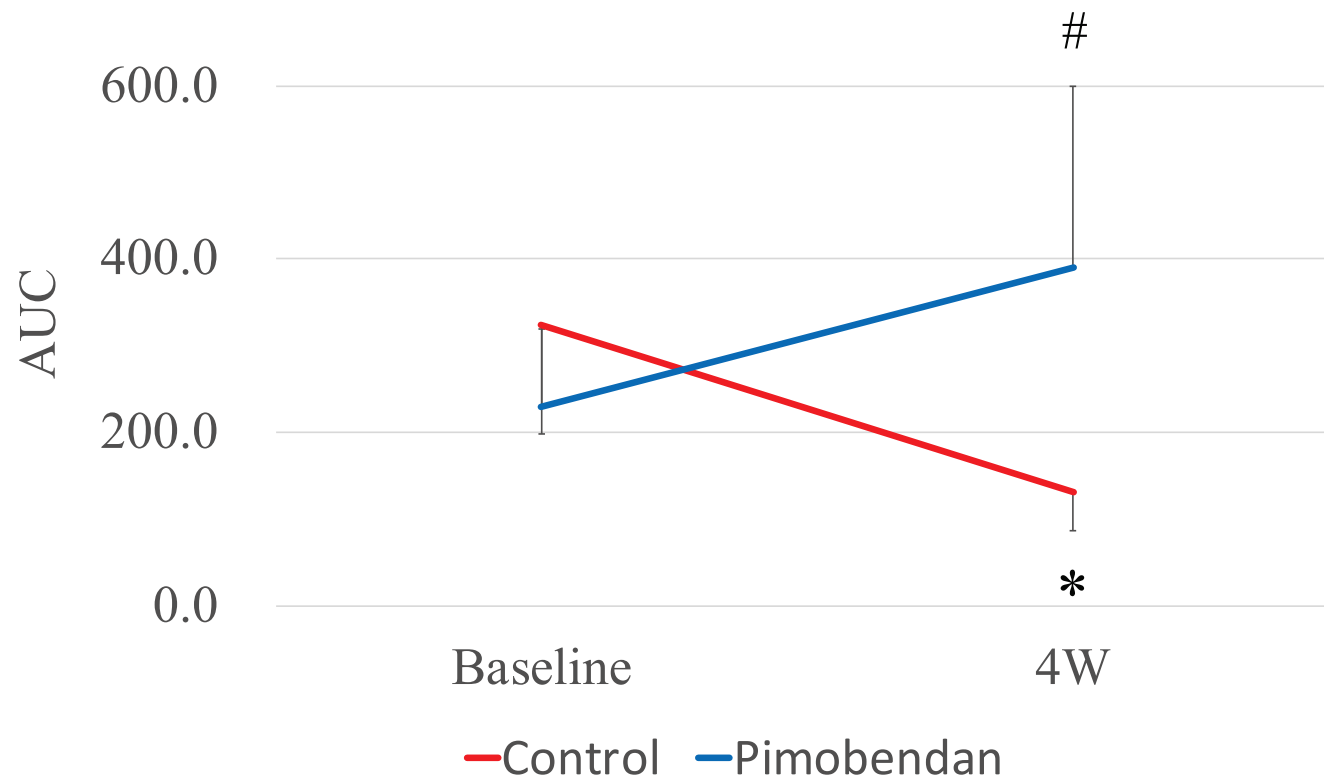


Fig. 3-5. コントロール群ならびにピモベンダン群における曲線下面積（AUC）の変化率

測定値は平均値 ± 標準偏差で示す。

コントロール群において、有意な AUC の低下が認められた。しかしながら、ピモベンダン群においては、その低下は認められなかった。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目, Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群, \*;  $p < 0.05$  vs. Baseline, #;  $p < 0.05$  vs. Control

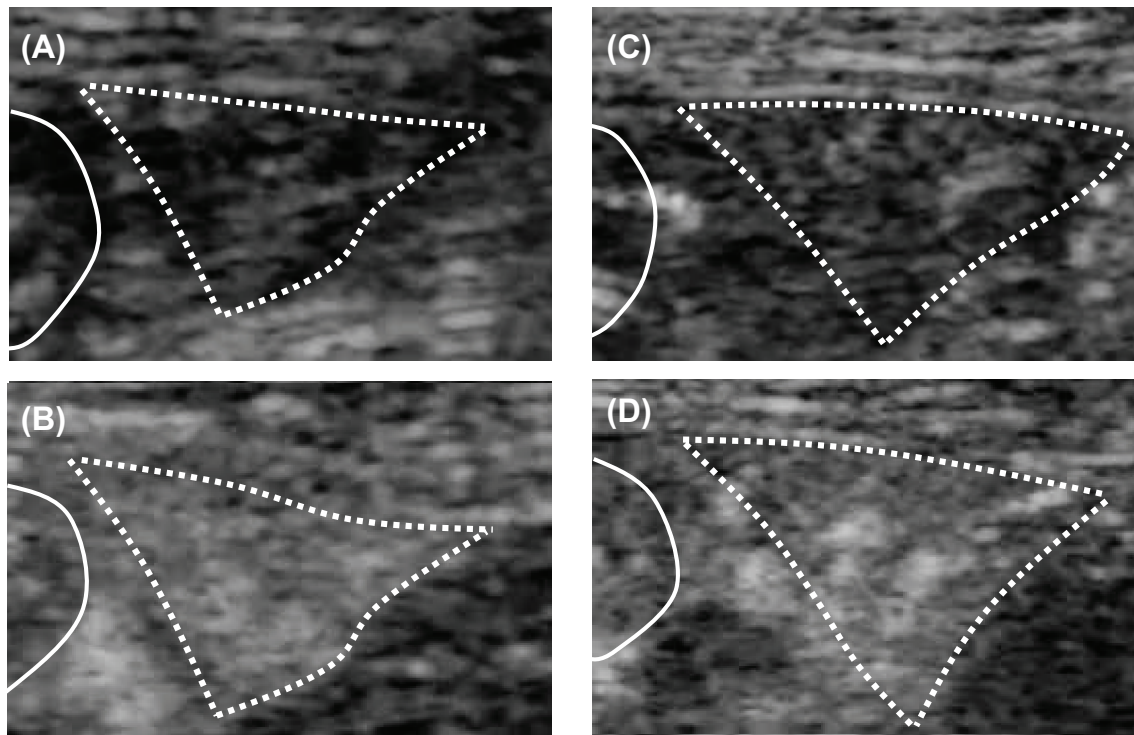


Fig. 3-6. ピモペンダン群における造影超音波検査における画像変化

A、B は高頻度心室刺激開始前（Baseline）における造影剤投与後の経時的変化を示す（A; 投与直後、B; 最も輝度が上昇した時間）。C、D は高頻度刺激開始 4 週間目（4W）における造影剤投与後の経時的変化を示す（D; 投与直後、E; 最も輝度が上昇した時間）。ピモペンダン群では、Baseline と同様に、4W においても輝度の上昇が認められた。

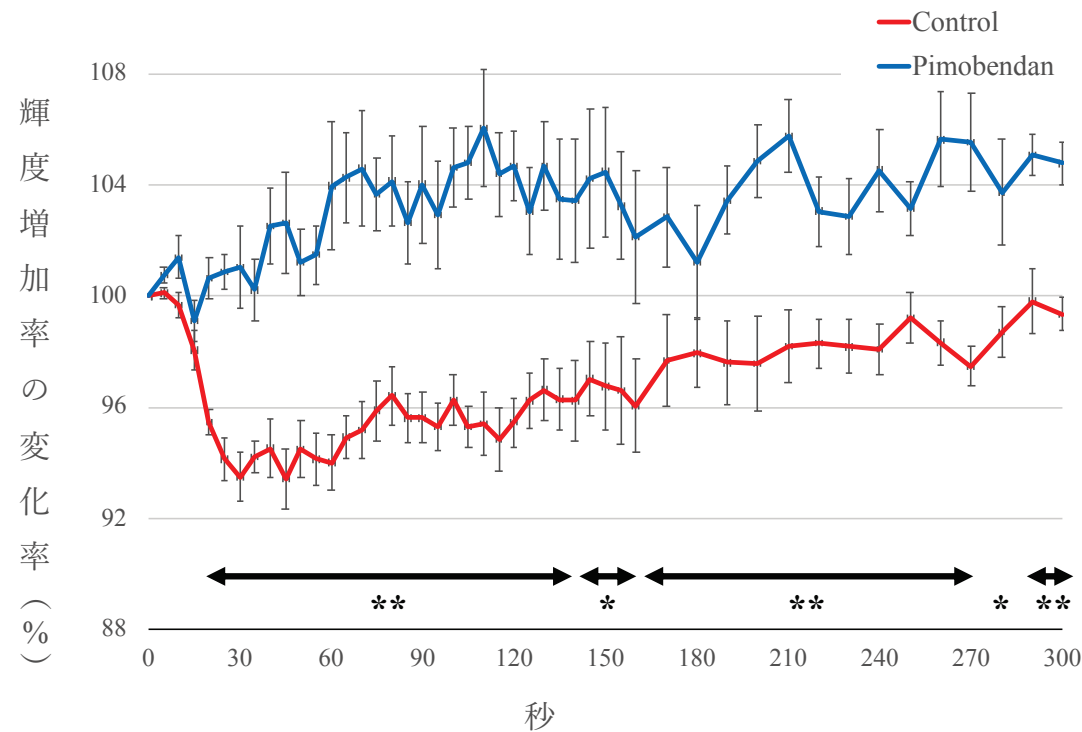


Fig. 3-7. コントロール群ならびにピモベンダン群における輝度増加率の変化率  
 ソナゾイド®投与後各時点において、高頻度心室刺激前の輝度増加率をそれぞれ 100%と定義し、4 週間の高頻度刺激によるこれら値の変化率を時点ごとに算出した。  
 各時点での輝度増加率の変化率は、平均値±標準誤差で示す。  
 ピモベンダン群における輝度増加率の変化率は、ソナゾイド®投与後のほぼ全て時点において、コントロール群におけるそれよりも有意に高値であった。  
 Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群, \*,  $p < 0.05$  vs. Control, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Control

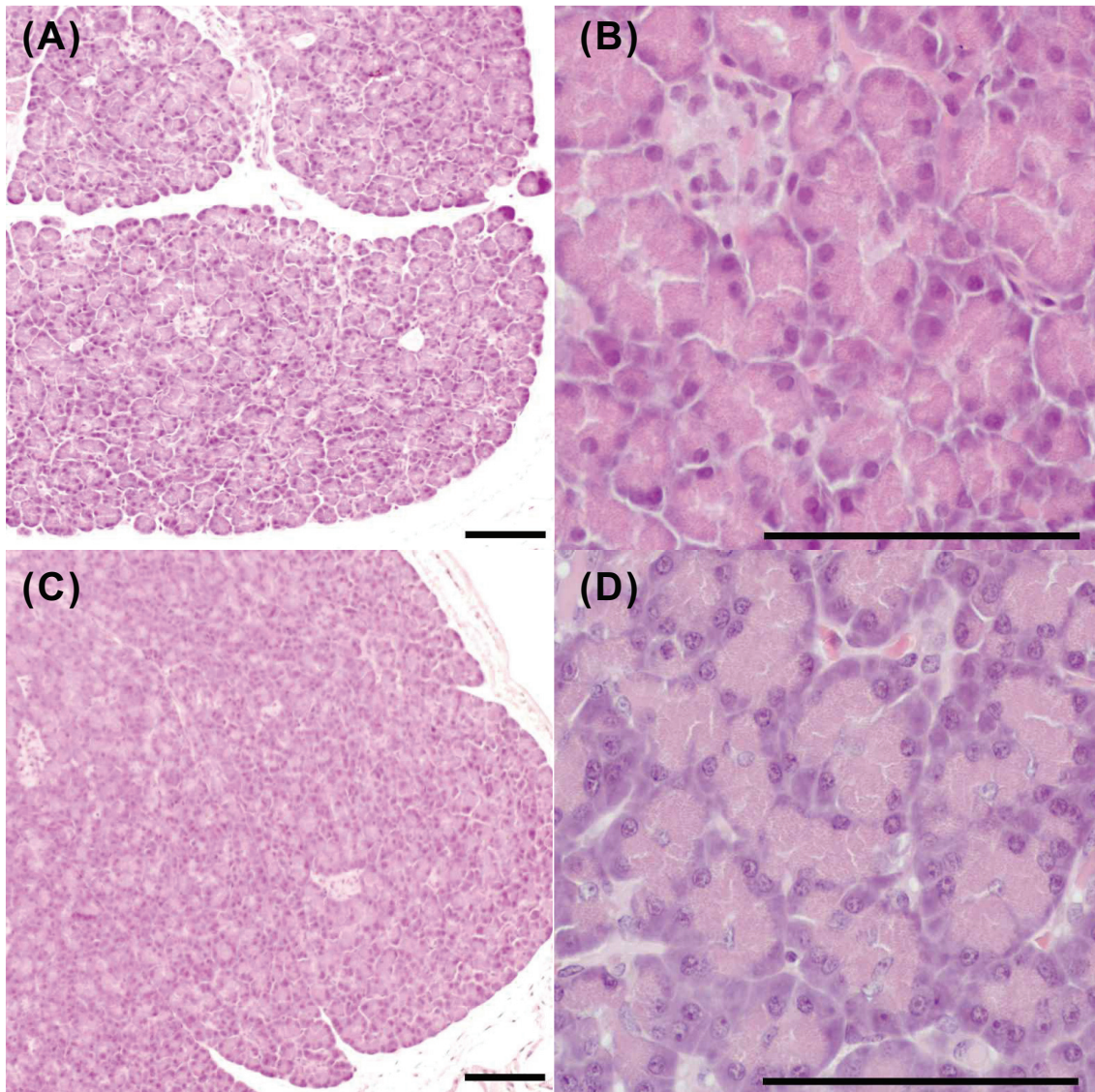


Fig. 3-8. ピモベンダン群における膵臓の病理組織学的変化

(A)、(B)

高頻度心室刺激前 (Baseline)。膵腺房細胞質内に好酸性のチモーゲン顆粒が見られた。

(C)、(D)

高頻度刺激開始 4 週間目 (4W)。ピモベンダン群では 4W においても病理組織学的な異常所見は認められなかった。Bars=100  $\mu$  m



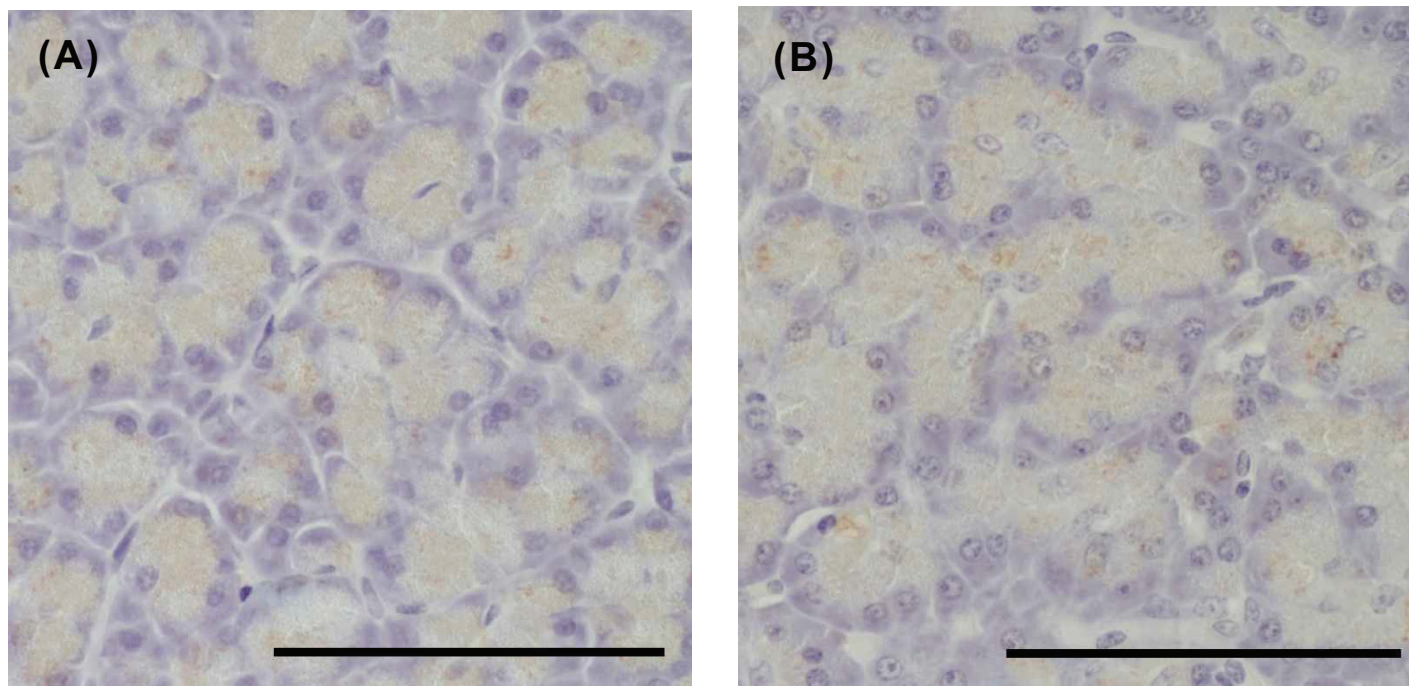


Fig. 3-9. ピモベンダン群における膵臓の免疫組織化学的变化

(A) 高頻度心室刺激前 (Baseline)。膵腺房細胞内のチモーゲン顆粒領域内において、トリプシノーゲン陽性反応が認められた。

(B) 高頻度刺激開始 4 週間目。Baseline と比較して、トリプシノーゲン陽性反応に関して変化は認められなかった。Bars=100  $\mu$  m



Table. 3-1. コントロール群ならびにピモベンダン群における心臓超音波測定値の経時的変化

Parameter	Group	Baseline			4W			
HR (bpm)	Control	101	±	10	150	±	8	*
	Pimobendan	108	±	15	137	±	25	
LA/Ao	Control	1.4	±	0.1	1.9	±	0.2	**
	Pimobendan	1.3	±	0.1	1.7	±	0.1	**
LVIDd (mm)	Control	30.2	±	2.4	39.9	±	3.6	**
	Pimobendan	32.4	±	1.5	40.4	±	2.4	**
LVIDs (mm)	Control	17.8	±	1.9	35.7	±	2.9	**
	Pimobendan	20.2	±	2.2	32.8	±	2.1	**
FS (%)	Control	40.9	±	4.6	10.6	±	2.5	**
	Pimobendan	37.6	±	5.8	18.8	±	3.7	**, ##
PEP/ET	Control	0.3	±	0.0	0.5	±	0.0	**
	Pimobendan	0.3	±	0.0	0.4	±	0.1	**, #
SV (ml)	Control	18.3	±	3.3	10.3	±	1.5	**
	Pimobendan	19.4	±	3.0	16.4	±	5.9	
CO (l/min)	Control	2.1	±	0.2	1.5	±	0.4	*
	Pimobendan	2.1	±	0.3	2.1	±	0.5	#
CI (l/min/m <sup>2</sup> )	Control	4.3	±	0.6	3.0	±	0.9	*
	Pimobendan	4.4	±	0.7	4.5	±	1.0	#

各検査値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群,

HR; 心拍数, LA/Ao; 左心房－大動脈径比, LVIDd; 拡張末期左心室内径,

LVIDs; 収縮末期左心室内径, FS; 左心室内径短縮率,

PEP/ET; 前駆出時間－駆出時間比, SV; 左心室 1 回拍出量,

CO; 心拍出量, CI; 心係数,

\*;  $p < 0.05$  vs. Baseline; \*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline,

#;  $p < 0.05$  vs. Control, ##;  $p < 0.01$  vs. Control

Table. 3-2. コントロール群ならびにピモベンダン群における血圧測定値の経時的変化

Parameter	Group	Baseline			4W			
SBP (mmHg)	Control	142.7	±	12.7	102.6	±	7.8	**
	Pimobendan	147.7	±	17.2	124.0	±	10.2	##
MBP (mmHg)	Control	97.9	±	4.1	72.9	±	12.0	*
	Pimobendan	110.0	±	12.3	88.1	±	7.9	#
DBP (mmHg)	Control	77.2	±	6.5	57.9	±	13.5	
	Pimobendan	84.7	±	10.0	71.6	±	9.4	

各検査値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群,

SBP; 収縮期血圧, MBP; 平均血圧, DBP; 拡張期血圧,

\*;  $p < 0.05$  vs. Baseline; \*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline,

#;  $p < 0.05$  vs. Control, ##;  $p < 0.01$  vs. Control

Table. 3-3. 中心静脈圧が baseline においては、4W においては 5, 10  
あるいは 15 mmHg であると仮定した場合の、コントロール群ならびに  
ピモベンダン群における体血管抵抗の経時的变化

	mmHg	Group	Period					
			baseline			4W		
SVR (dynes×sec×cm <sup>-5</sup> )	5	Control	3,501	±	401	3,554	±	887
		Pimobendan	4,149	±	917	3,232	±	778
	10	Control				3,293	±	849
		Pimobendan				3,037	±	732
	15	Control				3,032	±	811
		Pimobendan				2,841	±	688

各検査値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群,

SVR; 体血管抵抗

Table. 3-4. コントロール群ならびにピモベンダン群における造影超音波測定値の経時的変化

Parameter	Group	Baseline			4W			
PI (%)	Control	111.2	±	3.4	105.5	±	1.7	*
	Pimobendan	109.9	±	3.9	114.6	±	7.3	#
AUC	Control	324.9	±	126.9	130.3	±	43.2	*
	Pimobendan	228.7	±	90.3	389.7	±	210.7	#
TP (sec)	Control	55.0	±	21.2	113.0	±	34.7	*
	Pimobendan	79.0	±	15.9	71.0	±	10.2	#
TTU (sec)	Control	21.0	±	4.9	36.0	±	17.7	
	Pimobendan	24.0	±	3.7	28.0	±	6.0	
TTW (sec)	Control	254.0	±	54.6	211.0	±	54.1	
	Pimobendan	193.0	±	54.6	214.0	±	49.6	

各検査値は平均値 ± 標準偏差で示す。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群,

PI; 最高輝度増加率, AUC; 曲線下面積, TP; ピーク到達時間,

TTU; 初期上昇時間, TTW; ウォッシュアウト時間,

\*;  $p < 0.05$  vs. Baseline; #;  $p < 0.05$  vs. Control

Table. 3-5. コントロール群ならびにピモベンダン群における膵臓病理所見スコアの経時的変化

Group		Baseline			4W			
Score	Control	2.7	±	0.0	1.3	±	0.1	**
	Pimobendan	2.7	±	0.0	2.3	±	0.0	#

各スコアは平均値 ± 標準誤差で示す。

チモーゲン顆粒を含む膵腺房細胞が全体の 5%未満である場合は「0」、5-25%である場合は「1」、25-50%である場合は「2」、51%以上である場合は「3」とスコアリングした。ベースラインにおいては、膵臓部分切除術により、右葉あるいは左葉から膵臓組織をサンプリングした。4W においては、右葉、左葉および膵体部における各部位をスコアリングし、その平均値を採用した。

Baseline; 高頻度心室刺激前, 4W; 高頻度刺激開始 4 週間目,

Control; コントロール群, Pimobendan; ピモベンダン群,

\*\*;  $p < 0.01$  vs. Baseline, #;  $p < 0.05$  vs. Control

## 総括

心不全とは、心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じて心ポンプ機能が不全に陥った結果、心臓から十分な動脈血を拍出することが困難となり、運動不耐性、呼吸困難および浮腫などの様々な臨床徴候が出現した病態と定義されている。特に左心室収縮能の低下により心拍出量(cardiac output; CO)が低下すると、末梢組織や腹部諸臓器に十分な血流を供給できなくなり、それらの臓器に対して虚血/低灌流に基づく様々な障害を引き起こすことになる。

近年、心不全と膵腺房細胞傷害の間に関連性があることが示唆された。この報告によると、僧帽弁閉鎖不全症により心不全に陥った犬において、膵腺房細胞傷害を有する個体の比率が有意に上昇したとされている。そして、この膵腺房細胞傷害は、心機能低下による膵臓への低灌流の結果として引き起こされたものではないかと推測されている。しかしながら、この研究内では、実際に CO や膵臓血流量は測定されておらず、膵腺房細胞傷害が心不全に起因するものであるのか否かを検討するには、不十分なものであった。これまでに犬において、心ポンプ機能の低下により膵臓血流量が実際にどのように変化するのか検討した報告は認められない。さらに、これらの犬において、実際に膵臓組織にどのような影響が及ぼされるかについても不明なままである。

そこで本研究では、低拍出性心不全を惹起するとされる高頻度心室刺激(rapid ventricle pacing; RVP)犬を作出し、その膵臓血流量ならびに膵臓組織を評価することにより、CO の低下が膵臓に対し及ぼす影響について検討した。

第 1 章では、5 頭の健常ビーグル犬の右心室に 4 週間の RVP を与えた。そして、心不全時における臓器血流量の変化を検討するにあたり、RVP 犬が適切なモデルであるか否かを、心臓超音波検査や血圧測定を行うことにより評価した。その結果、心臓超音波検査では、左心室収縮力の低下ならびに CO

の低下が認められた。さらに、CO における個体差を体表面積により補正した心係数 (cardiac index; CI) は参考基準値を下回っていた。これらのことから、供試動物は RVP により心不全状態に陥っていたものと考えられた。また、血圧測定では、CO の低下に基づく平均血圧 (mean blood pressure; MBP) の低下が認められた。MBP は、臓器血流量を規定する最も重要な因子とされている。このことから、本研究を遂行するにあたり、RVP 犬は適切な心不全モデルであるものと判断した。

第 2 章では、RVP 犬を新たに 7 頭作出し、CO の低下が脾臓血流量ならびに脾臓組織に対し及ぼす影響について検討した。脾臓血流量は、造影超音波検査を使用し評価した。造影超音波検査は、超音波に対する反射源として作用する MB を血管内に投与することで、血流の可視化を可能とする超音波検査である。そして、時間経過による MB の輝度変化を基に TIC を作成することにより、対象とした臓器の血流動体の定量的評価が可能となる。その結果、輝度増強指標である最高輝度増加率 (Peak intensity; PI)、曲線下面積 (Area under the curve; AUC) の低下が認められた。PI ならびに AUC は、対象とした臓器に流入した MB の総流入量を示している。そのため、これら測定値の低下は、脾臓血流量の低下を意味するものであった。また、第 1 章と同様に、心臓超音波検査ならびに血圧検査において、左心室収縮力の低下に続く CO、CI および MBP の低下が認められた。そして、MBP は末梢臓器まで血液を送る駆動圧を反映していることから、今回の供試動物において認められた脾臓血流量の低下は、CO の低下により引き起こされたものであると判断した。また、脾臓の病理組織学的検査では、脾臓全域において、チモーゲン顆粒の減少を特徴とする脾腺房細胞の萎縮が認められた。これまでに犬において、脾臓に流入する動脈を遮断することにより、脾腺房細胞の萎縮/脱落に続く炎症細胞の浸潤および線維化など、慢性脾炎の病態に酷似した病理組織学的所見が引き起こされることが明らかとなっている。そして、これら変化



は経時的に増強するとされている。そのため、今回認められた腓腺房細胞の萎縮という病理学的変化は、腓臓の血流量の低下に起因するものであり、炎症反応の前段階の病態を反映しているものと考えられた。

以上のことから、左心室収縮力の低下に基づく CO の低下により腓臓血流量は減少し、さらには腓腺房細胞の萎縮が引き起こされることが明らかとなった。しかしながら、この病理学的変化が引き起こされた機序を解明することは出来ず、腓臓血流量の減少との因果関係を証明するには至らなかった。そこで、RVP による CO の低下に続く腓臓血流量の低下を軽減することができれば、その供試動物の腓臓を病理組織学的に評価することにより、腓臓血流量低下と腓腺房細胞萎縮との関連性をより明確にできると考えた。

第 3 章では、RVP 犬に心機能改善薬投与であるピモベンダン投与し、CO の低下が軽減された際の腓臓血流量の変化、ならびに腓腺房細胞の病理組織学的変化を評価した。その結果、心臓超音波検査において、ピモベンダン投与により左心室収縮力低下の軽減が認められた。さらに、CO ならびに CI の低下の抑制も認められた。これら心臓超音波検査測定項目値の変化は、ピモベンダンの陽性変力作用によってもたらされたものと考えられた。造影超音波検査では、ピモベンダン投与により PI ならびに AUC の低下の抑制が認められた。また、血圧測定値に関しても、MBP 低下の軽減が認められた。これらのことから、ピモベンダン投与による腓臓血流量の維持は、心ポンプ機能の維持により CO の低下が抑制されたことによるものと判断した。病理組織学的検査では、ピモベンダンを投与した RVP 犬においては、無投薬の RVP 犬において生じた腓腺房細胞の形態的变化、すなわちチモーゲン顆粒の減少を特徴とする腓腺房細胞萎縮は認められなかった。このことから、腓腺房細胞萎縮を直接的に引き起こした要因は、CO の低下に起因する腓臓血流量の低下であると結論づけた。

以上、本研究により、心不全は腓臓血流量の低下を招来し、腓腺房細胞萎

縮を引き起こすという新たな知見が得られた。そして、犬の心不全における新たな治療戦略として、脾臓の低灌流性傷害の存在に留意する必要があることが示された。

## 謝 辞

本稿を終わるに臨み、本研究に際して終始に渡り丁寧かつ熱心な御指導ならびに御助言を賜りました東京農工大学動物医療センター福島研究室・福島隆治教授に深謝いたします。また、東京農工大学獣医臨床腫瘍学研究室・町田登教授、東京農工大学獣医外科学研究室・打出毅教授、岩手大学小動物病態診断学研究室・山崎真大教授にも本研究に関する御指導・御助言を頂き、ここに感謝の意を表します。

本研究の共同研究者として、ご協力およびご指導賜りました鹿児島大学共同獣医学部・三浦直樹教授ならびに同学部附属動物病院・岩永朋子助教に感謝いたします。

そして、本研究に対し、多大なるご支援ならびにご協力を賜りました東京農工大学動物医療センター福島研究室の大学院生（大森貴裕先生、河口貴恵先生、山田修作先生）、学生（伊藤こころ氏、石井凌氏、和田悠平氏、松村悠里氏、大沼悠輝先生、本野翔太先生、菅野瑛太先生、桃井義士先生）にも深くお礼申し上げます。

最後に本研究に対し、貴重な生命を提供して頂いた供試動物に心から感謝の気持ちを捧げたいと思います。

## 引用文献

- [1]. Hall, E. J. 2011. Rhythmical excitation of the heart. pp. 115-120. *In: Guyton and Hall Textbook of medical physiology, 12th ed. (Hall, E. J. ed.), Elsevier, Philadelphia.*
- [2]. Klabunde, R. E. 2012. Cardiac function. pp. 60-92. *In: Cardiovascular physiology concepts, 2nd ed. (Klabunde, R. E. ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.*
- [3]. Hall, E. J. 2011. Cardiac muscle; The heart as a pump and Function of the heart valves. pp. 101-113. *In: Guyton and Hall Textbook of medical physiology, 12th ed. (Hall, E. J. ed.), Elsevier, Philadelphia.*
- [4]. Moise, N. S. 1999. Diagnosis and management of canine arrhythmias. pp. 331-385. *In: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.*
- [5]. Hall, E. J. 2011. Cardiac shock and its treatment. pp. 273-282. *In: Guyton and Hall Textbook of medical physiology, 12th ed. (Hall, E. J. ed.), Elsevier, Philadelphia.*
- [6]. Sisson, D. O'grady, M. R. and Calvert, C. A. 1999. Myocardial diseases of dogs. pp. 581-619. *In: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.*
- [7]. Klabunde, R. E. 2012. Cardiovascular integration, adaptation, and pathophysiology. pp. 198-234. *In: Cardiovascular physiology concepts, 2nd ed. (Klabunde, R. E. ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.*
- [8]. Fouad, Y. M. and Yehia, R. 2014. Hepato-cardiac disorders. *World J. Hepatol.* **6**: 41-54.

- [9]. Ronco, C., Cicoira, M. and McCullough, P. A. 2012. Cardiorenal syndrome type 1: pathophysiological crosstalk leading to combined heart and kidney dysfunction in the setting of acutely decompensated heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**: 1031-1042.
- [10]. Sandek, A., Swidsinski, A., Schroedl, W., Watson, A., Valentova, M., Herrmann, R., Scherbakov, N., Cramer, L., Rauchhaus, M., Grosse-Herrenthey, A., Krueger, M., von Haehling, S., Doehner, W., Anker, SD. and Bauditz, J. 2014. Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**: 1092-1102.
- [11]. Warshaw, A. L. and O'Hara, P. J. 1978. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann. Surg.* **188**: 197-201.
- [12]. Han, D., Choi, R. and Hyun, C. 2015. Canine pancreatic-specific lipase concentrations in dogs with heart failure and chronic mitral valvular insufficiency. *J. Vet. Intern. Med.* **29**: 180-183.
- [13]. Machida, N. 2001. Shock. pp. 114-116. *In: General Animal Pathology*, 2th ed. (The Japanese Society of Veterinary Pathology. ed.), Buneido-syuppan, Tokyo (in Japanese).
- [14]. Morgan, D, E., Tomlinson, C. W., Qayumi, A. K., Toleikis, P. M., McConville, B. and Jamieson, W. R. 1989. Evaluation of ventricular contractility indexes in the dog with left ventricular dysfunction induced by rapid atrial pacing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **14**: 489-495.
- [15]. Wilson, J. R., Douglas, P., Hickey, W. F., Lanocce, V., Ferraro, N., Muhammad, A. and Reichel, N. 1987. Experimental congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing in the dog: cardiac effects. *Circulation* **75**: 857-867.

- [16]. Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V. P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., Rutten, F. H. and van der Meer, P; ESC Scientific Document Group. 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* **37**: 2129-2200.
- [17]. Bonnett, B. N., Egenvall, A., Hedhammar, A. and Olson, P. 2005. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta. Vet. Scand.* **46**:105-120.
- [18]. Bonnett, B. N., Egenvall, A., Hedhammar, A. and Olson, P. 2005. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: II. Breed-specific age and survival patterns and relative risk for causes of death. *Acta. Vet. Scand.* **46**: 121-136.
- [19]. Calvert, C. A. and Brown, J. 1986. Use of M-mode echocardiography in the diagnosis of congestive cardiomyopathy in Doberman pinschers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **189**: 293-297.
- [20]. Calvert, C. A., Chapman, W. L. Jr. and Toal, R. L. 1986. Congestive cardiomyopathy in Doberman pinscher dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **181**: 598-602.
- [21]. Häggström, J., Hansson, K., Karlberg, B. E., Kvart, C. and Olsson, k.

1994. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniels. *Am. J. Vet. Res.* **55**: 698-703.
- [22]. Kittleson, M. D., Eyster, G. E., Knowlen, G. G., Bari Olivier, N. and Anderson, L. K. 1984. Myocardial function severe congestive mitral regurgitation. Myocardial function in small dogs with chronic mitral regurgitation and severe congestive heart failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **184**: 455-459.
- [23]. Kittleson, M. D., Johnson, L. E. and Oliver, N. B. 1985. Acute hemodynamic effects of hydralazine in dogs with chronic mitral regurgitation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **187**: 258-261.
- [24]. Levisman, J. A. 1977. Echocardiographic diagnosis of mitral regurgitation in congestive cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **93**: 33-39.
- [25]. Lord, P. F. 1976. Left ventricular diastolic stiffness in dogs with congestive cardiomyopathy and volume overload. *Am. J. Vet. Res.* **37**: 953-957.
- [26]. Patterson, D. F. 1968. Epidemiologic and genetic studies of congenital heart disease in the dog. *Circ. Res.* **23**: 171-202.
- [27]. Klabunde, R. E. 2012. Vascular function. pp. 93-123. *In*: Cardiovascular physiology concepts, 2nd ed. (Klabunde, R. E. ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [28]. Miller, S. M., Tilley, P. L. and Detweiler, K. D. 1993. Blood, Circulation, and the Cardiovascular System. pp. 1-244. *In*: Dukes' Physiology of Domestic Animals, 11<sup>th</sup> ed. (Swenson, J. M. and Reece, O. W. ed.), Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press, Ithaca and London.
- [29]. Grover, M. and Glantz, S. A. 1983. Endocardial pacing site affects left



- ventricular end-diastolic volume and performance in the intact anesthetized dog. *Circ. Res.* **53**: 721-85.
- [30]. Crane, W. S., Griffin, W. R. and Messent, R. P. 2000. Introduction to commercial pet foods. pp. 111-126. *In*: Small Animal Clinical Nutrition, 4th ed. (Thatcher, D. C., Remillard, L. R. and Roudebush, P. eds.), Mark Morris Institute Hand, Kansas.
- [31]. Fukushima, R., Tanaka, R., Matsumoto, H., Machida, N., Hirose, H., Yamane, Y. and Koyama, H. 2010. Effect of enfonidipine hydrochloride in dogs with experimental supraventricular tachyarrhythmia. *J. Vet. Med. Sci.* **72**: 833-838.
- [32]. Moise, N. S. and Fox, P. R. 1999. Echocardiography and Doppler Imaging. pp. 130-171. *In*: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- [33]. Feigenbaum, H. 1986. Echocardiographic evaluation of cardiac chambers. pp. 127-187. *In*: Echocardiography, 4th ed., (Feigenbaum, H. ed.), Lea & Febiger, Philadelphia.
- [34]. Matsuno, Y., Morioka, S., Murakami, Y., Kobayashi, S. and Moriyama, K. 1988. Mechanism of prolongation of pre-ejection period in the hypertrophied left ventricle with normal systolic function in unanesthetized hypertensive dogs. *Clin. Cardiol.* **11**: 702-706.
- [35]. Littman, M. P. and Fox, P. R. 2012. Systemic hypertension: Recognition and treatment. pp. 795-813. *In*: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.

- [36]. della Torre, P. K., Kirby, A. C., Church, D. B. and Malik, R. 2000. Echocardiographic measurements in greyhounds, whippets and Italian greyhounds--dogs with a similar conformation but different size. *Aust. Vet. J.* **78**: 49-55.
- [37]. Dell'Italia, L. J., Starling, M. R., Blumhardt, R., Lasher, J. C. and O'Rourke, R. A. 1985. Comparative effects of volume loading, dobutamine, and nitroprusside in patients with predominant right ventricular infarction. *Circulation* **72**: 1327-1335.
- [38]. Onogawa, T., Sakamoto, Y., Nakamura, S., Nakayama, S., Fujiki, H. and Yamamura, Y. 2011. Effects of tolvaptan on systemic and renal hemodynamic function in dogs with congestive heart failure. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* **25**: 67-76.
- [39]. Kittleson, M. D. and Kienle, R. D. 1998. Pulmonary arterial and systemic arterial hypertension. pp. 523-542. *In*: Small Animal Cardiovascular Medicine. (Kittleson, M. D. and Kienle, R. D. eds.), Mosby, St Louis (in Japanese).
- [40]. Kishikawa, K., Namiki, A. and Iwasaki, H. 1989. The cardiovascular effects of naloxone administration after fentanyl anesthesia in hypercapnic patients. *J. Anesth.* **3**: 48-53.
- [41]. Bonn, A. L. M-Mode Echocardiography: A Quantitative Assessment. 2002. pp. 40-54. *In*: Two Dimensional and M-Mode Echocardiography, 1<sup>st</sup> ed. (Boon, A. J. ed.), Teton New Media, Wyoming.
- [42]. Kittleson, M. D. and Kienle, R. D. 1998. Cardiac embryology and anatomy. pp. 1-42. *In*: Small Animal Cardiovascular Medicine. (Kittleson, M. D. and Kienle, R. D. eds.), Mosby, St Louis (in Japanese).

- [43]. Yamazoe, M., Hoshino, Y., Toeda, T., Oda, H., Izumi, t., Arai, Y., Shibata, A., Makino, H. and Saito, Y. 1986. Evaluation of left ventricular residual function using postextrasystolic potentiation. Relation between systolic time intervals and angiographic study. *Jpn. Hear J.* **27**: 797-811.
- [44]. Coudhury, A., Varughese, G. I. and Liq, G. Y. 2005. Targeting the renin-angiotensin-aldosterone-system in atrial fibrillation: a shift from electrical to structural therapy? *Expert. Opin. Pharmacother.* **6**: 2193-2207.
- [45]. Healey, J. S., morillo, C. A. and Connolly, S. J. 2005. Role of the rennin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation and cardiac remodeling. *Curr. Opin. Cardiol.* **20**: 31-37.
- [46]. Klabunde, R. E. 2012. Neurohumoral control of the heart and circulation. pp. 124-147. *In*: Cardiovascular physiology concepts, 2nd ed. (Klabunde, R. E. ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [47]. Halmin, R. L. Pathophysiology of the failing heart. pp. 205-215. *In*: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- [48]. Haskins, S. C. 1999. Treatment of shock. pp. 272-290. *In*: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- [49]. Lange, G., Lu, H. H., Chang, A. and Brools, C. M. 1966. Effect of stretch on the isolated cat sinoatrial node. *Am. J. Physiol.* **211**: 1192-1196.

- [50]. Shinbane, J. S., Wood, M. A., Jensen, D. N., Ellenbogen, K. A., Fitzpatrick, A. P. and Scheinman, M. M. 1997. Tachycardia-induced cardiomyopathy: a review of animal models and clinical studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* **15**: 709-715.
- [51]. Bigatello, L. M. and George, E. 2002. Hemodynamic monitoring. *Minerva Anesthesiol.* **68**: 219-225.
- [52]. Takagaki, M., McCarthy, P. M., Tabata, T., Dessoify, R., Cardon, L. A., Connor, J., Ochiai, Y., Thomas, J. D., Francis, G. S., Young, J. B. and Fukamachi, K. 2002. Induction and maintenance of an experimental model of severe cardiomyopathy with a novel protocol of rapid ventricular pacing. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **123**: 544-549.
- [53]. Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J., Hamlin, R., Keene, B., Luis-Fuentes, V. and Stepien, R. 2009. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* **23**: 1142-1150.
- [54]. Sisson, D. Kwart, and C. Darke, P. G. G. 1999. Acquired valvular heart disease in dogs and cats. pp. 536-565. *In*: Textbook of canine and feline cardiology: principle and clinical practice, 2nd ed. (Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, N. S. eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- [55]. Lim, S. Y., Nakamura, K., Morishita, K., Sasaki, N., Murakami, M., Osuga, T., Ohta, H., Yamasaki, M. and Takiguchi, M. 2013. Qualitative and quantitative contrast enhanced ultrasonography of the pancreas using bolus injection and continuous infusion methods in normal dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 1601-1607.
- [56]. Lim, S. Y., Nakamura, K., Morishita, K., Sasaki, N., Murakami, M., Osuga, T., Ohta, H., Yamasaki, M. and Takiguchi, M. 2014. Qualitative

- and quantitative contrast-enhanced ultrasonographic assessment of cerulein-induced acute pancreatitis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **28**: 496-503.
- [57]. Lim, S. Y., Nakamura, K., Morishita, K., Sasaki, N., Murakami, M., Osuga, T., Yokoyama, N., Ohta, H., Yamasaki, M. and Takiguchi, M. 2015. Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic assessment of naturally occurring pancreatitis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **29**: 71-78.
- [58]. Trivedi, S., Marks, S. L., Kass, P. H., Luff, J. A., Keller, S. M., Johnson, E. G. and Murphy, B. 2011. Sensitivity and specificity of canine pancreas-specific lipase (cPL) and other markers for pancreatitis in 70 dogs with and without histopathologic evidence of pancreatitis. *J. Vet. Intern. Med.* **25**: 1241-1247.
- [59]. Haers, H., Daminet, S., Smets, P. M. Y., Duchateau, L., Aresu, L. and Saunders, J.H. 2013. Use of quantitative contrast-enhanced ultrasonography to detect diffuse renal changes in beagles with iatrogenic hypercortisolism. *Am. J. Vet. Res.* **74**: 70-77.
- [60]. Kersting, S., Konopke, R., Kersting, F., Volk, A., Distler, M., Bergert, H., Saeger, H. D., Grützmann, R. and Bunk, A. 2009. Quantitative perfusion analysis of transabdominal contrast-enhanced ultrasonography of pancreatic masses and carcinomas. *Gastroenterology* **137**: 1903-1911.
- [61]. Kersting, S., Ludwig, S., Ehehalt, F., Volk, A. and Bunk, A. 2013. Contrast-enhanced ultrasonography in pancreas transplantation. *Transplantation* **95**: 209-214.
- [62]. Greis, C. 2009. Ultrasound contrast agents as markers of vascularity and microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **43**: 1-9.

- [63]. Watanabe, R., Matsumura, M., Chen, C. J., Kaneda, Y., Ishihara, M. and Fujimaki, M. 2003. Gray-scale liver enhancement with Sonazoid (NC100100), a novel ultrasound contrast agent; detection of hepatic tumors in a rabbit model. *Biol. Pharm. Bull.* **26**:1272–1277.
- [64]. Hatanaka, K., Kudo, M., Minami, Y., Ueda, T., Tatsumi, C., Kitai, S., Takahashi, S., Inoue, T., Hagiwara, S., Chung, H., Ueshima, K. and Maekawa, K. 2008. Differential diagnosis of hepatic tumors: value of contrast-enhanced harmonic sonography using the newly developed contrast agent, Sonazoid. *Intervirolgy* **51**: 61-69.
- [65]. Greis, C. 2011. Quantitative evaluation of microvascular blood flow by contrast-enhanced ultrasound (CEUS). *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **49**: 137–149.
- [66]. Matsubara, H, Hirooka, Y., Itoh, A., Kawashima, H., Ohno, E., Ishikawa, T., Ito, Y., Nakamura, Y., Hiramatsu, T., Nakamura, M., Miyahara, R., Ohmiya, N. and Goto, H. 2011. Quantitative analysis of pancreatic disorders using contrast-enhanced endoscopic ultrasonography. *Suizo* **26**: 6-10 (in Japanese).
- [67]. Brenner, K., Harkin, K. R., Andrews, G. A. and Kennedy, G. 2009. Juvenile Pancreatic Atrophy in Greyhounds: 12 Cases (1995–2000). *J. Vet. Intern. Med.* **23**: 67-71.
- [68]. Bostrom, B. M., Xenoulis, P. G., Newman, S. J., Pool, R. R., Fosgate, G. T. and Steiner, J. M. 2013. Chronic pancreatitis in dogs: A retrospective study of clinical, clinicopathological, and histopathological findings in 61 case. *Vet. J.* **195**: 73-79.
- [69]. Rimaila-Parnanen, E. and Westermarck, E. 1982. Pancreatic degenerative atrophy and chronic pancreatitis in dogs. *Acta. Vet. Scand.*

**23:** 400–406.

- [70]. Tanaka, T., Ichiba, Y., Miura, Y., Ito, H. and Dohi, K. 1994. Canine model of chronic pancreatitis due to chronic ischemia. *Digestion* **55**: 86-89.
- [71]. Kotani, T 2001. Circulatory disturbance. pp. 91-108. *In: General Animal Pathology*, 2th ed. (The Japanese Society of Veterinary Pathology. ed.), Buneido-syuppan, Tokyo (in Japanese).
- [72]. Takahashi, T. and Yaginuma, N. 1985. Ischemic injury of the human pancreas. Its basic patterns correlated with the pancreatic microvasculature. *Pathol. Res. Pract.* **179**: 645-651.
- [73]. Shimamatsu, K. and Wanless, I. R. 1997. Role of Ischemia in Causing Apoptosis, Atrophy, and Nodular Hyperplasia in Human Liver. *Hepatology*. **26**: 343-350.
- [74]. Majno, G. and Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15.
- [75]. Silva, M. T, do Vale, A. and dos Santos, N. M. 2008. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. **13**: 463-482.
- [76]. Säteri, H. 1975. Investigations on the exocrine pancreatic function in dogs suffering from chronic exocrine pancreatic insufficiency. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* **53**: 1-86.
- [77]. Wiberg, M. E. 2004. Pancreatic acinar atrophy in German shepherd dogs and rough-coated collies. Etiopathogenesis, diagnosis and treatment. A review. *Vet. Q.* **26**: 61-75.
- [78]. Wiberg, M. E., Saari, S. A. and Westermarck, E. 199. Exocrine pancreatic atrophy in German Shepherd Dogs and Rough-coated

- Collies: an end result of lymphocytic pancreatitis. *Vet. Pathol.* **36**: 530-541.
- [79]. Hall, E. J. 2011. Secretory Functions of the Alimentary Tract. pp. 773-787. *In*: Guyton and Hall Textbook of medical physiology, 12th ed. (Hall, E. J. ed.), Elsevier, Philadelphia.
- [80]. Maeda, H. 1986. Ductal and vascular factors in etiology of experimentally induced pancreatic fibrosis and fat replacement in dogs. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 83: 2580-2587 (in Japanese).
- [81]. Sardesai, V. M. and Orten, J. M. 1968. Effect of Prolonged Alcohol Consumption in Rats on Pancreatic Protein Synthesis. *J. Nutr.* **96**: 241-346.
- [82]. Ohta, H., Kojima, K., Yokoyama, N., Sasaki, N., Kagawa, Y., Hanazono, K., Ishizuka, T., Morishita, K., Nakamura, K., Takagi, S. and Takiguchi, M. 2018. Effects of immunosuppressive prednisolone therapy on pancreatic tissue and concentration of canine pancreatic lipase immunoreactivity in healthy dogs. *Can. J. Vet. Res.* **82**: 278-286.
- [83]. McCord, K., Morley, P. S., Armstrong, J., Simpson, K., Rishniw, M., Forman, M. A., Biller, D., Parnell, N., Arnell, K., Hill, S., Avgeris, S., Gittelman, H., Moore, M., Hitt, M., Oswald, G., Marks, S., Burney, D. and Twedt, D. A multi-institutional study evaluating the diagnostic utility of the spec cPL™ and SNAP® cPL™ in clinical acute pancreatitis in 84 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **26**: 888-896.
- [84]. Peitzman, A. B., Billiar, T. R., Harbrecht, B. G., Kelly, E., Udekwu, A. O. and Simmons, R. L. 1995. Hemorrhagic shock. *Curr. Probl. Surg.* **32**: 925-1002.
- [85]. Harmoinen, J., Saari, S., Rinkinen, M. and Westermarck, E. 2002.



- Evaluation of Pancreatic Forceps Biopsy by Laparoscopy in Healthy Beagles. *Vet. Ther.* **3**: 31-36.
- [86]. Cook, A. K., Breitschwerdt, E. B., Levine, J. F., Bunch, S. E. and Linn, L. O. 1993. Risk factors associated with acute pancreatitis in dogs: 101 cases (1985-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203**: 673-679.
- [87]. Lem, K. Y., Fosgate, G. T., Norby, B. and Steiner, J. M. 2008. Associations between dietary factors and pancreatitis in dogs. *J. AM. Vet. Med. Assoc.* **233**: 1425-1431.
- [88]. Schwartz, P., Kovak, J. R., Koprowski, A., Ludwig, L. L., Monette, S. and Bergman, P. J. 2008. Evaluation of prognostic factors in the surgical treatment of adrenal gland tumors in dogs: 41 cases (1999–2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **232**: 77-84.
- [89]. Endoh, M. 2008. Cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers. *Circ. J.* **72**: 1915-1925.
- [90]. Klabunde, R. E. 2012. Cellular structure and function. pp. 41-59. *In*: Cardiovascular physiology concepts, 2nd ed. (Klabunde, R. E. ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [91]. Ding, G., Wiegerinck, R. F., Shen, M., Cojoc, A., Zeidenweber, C. M. and Wagner, M. B. 2008. Dopamine increases L-type calcium current more in newborn than adult rabbit cardiomyocytes via D1 and  $\beta 2$  receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**: H2327-2335.
- [92]. Langer, G. A. 1972. Effects of digitalis on myocardial ionic exchange. *Circulation* **46**: 180-7.
- [93]. Boyle, K. L. and Leech, E. 2012. A review of the pharmacology and clinical uses of pimobendan. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* **22**: 398-408.

- [94]. Fuentes, V. L., Corcoran, B., French, A., Schober, K. E., Kleemann, R. and Justus, C. 2002. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of pimobendan in dogs with dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* **16**: 255-261.
- [95]. Lombard, C. W., Jons, O. and Bussadori, C. M. 2006. Clinical efficacy of pimobendan versus benazepril for the treatment of acquired atrioventricular valvular disease in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **42**: 249-261.
- [96]. O'Grady, M. R., Minors, S. L., O'Sullivan, M. L. and Horne, R. Effect of pimobendan on case fatality rate in Doberman Pinschers with congestive heart failure caused by dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* **22**: 897-904.
- [97]. Smith, P. J., French, A. T., Van Israël, N., Smith, S. G., Swift, S. T., Lee, A. J., Corcoran, B. M. and Dukes-McEwan, J. 2005. Efficacy and safety of pimobendan in canine heart failure caused by myxomatous mitral valve disease. *J. Small. Anim. Pract.* **46**: 121-130.
- [98]. Strickland, K. N. 2008. Pathophysiology and therapy of heart failure. pp. 288-314. *In: Manual of canine and feline cardiology*, 4th edition. (Tilley, L. P, Smith, F. W. K. Jr, Oyama, M. A. and Sleeper, M. M. eds.), WB Saunders, Philadelphia.
- [99]. Tjostheim, S. S., Kellihan, H. B., Grint, K. A. and Stepien, R. L. 2019. Effect of sildenafil and pimobendan on intracardiac heartworm infections in four dogs. *J. Vet. Cardiol.* **23**: 96-103.
- [100]. Solaro, R. J., Fujino, K. and Sperelakis, N. 1989. The positive inotropic effect of pimobendan involves stereospecific increases in the calcium sensitivity of cardiac myofilaments. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*

- [101]. Ohte, N., Cheng, C. P., Suzuki, M. and Little, W. C. 1997. The cardiac effects of pimobendan (but not amrinone) are preserved at rest and during exercise in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**: 23-31.
- [102]. Suzuki, S., Fukushima, R., Ishikawa, T., Hamabe, L., Aytemiz, D., Huai-Che, H., Nakao, S., Machida, N. and Tanaka, R. 2011. Pimobendan on left atrial pressure in dogs with mitral valve regurgitation. *J. Vet. Intern. Med.* **25**: 1328-33.
- [103]. Kanno, N., Kuse, H., Kawasaki, M., Hara, A., Kano, R. and Sasaki, Y. 2007. Effects of pimobendan for mitral valve regurgitation in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 373-377.
- [104]. Boswood, A., Häggström, J., Gordon, S. G., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., Keene, B. W., Bonagura, J., MacDonald, K. .A, Patteson, M., Smith, S., Fox, P. R., Sanderson, K., Woolley, R., Szatmári, V., Menaut, P., Church, W. M., O'Sullivan, M. L., Jaudon, J. P., Kresken, J. G., Rush, J., Barrett, K. A., Rosenthal, S. L., Saunders, A. B., Ljungvall, I., Deinert, M., Bomassi, E., Estrada, A. H., Fernandez Del Palacio, M. J., Moise, N. S., Abbott, J. A., Fujii, Y., Spier, A., Luethy, M. W., Santilli, R. A., Uechi, M., Tidholm, A. and Watson, P. 2016. Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: the epic study-a randomized clinical trial. *J. Vet. Intern. Med.* **30**: 1765-1779.
- [105]. Häggström, J., Boswood, A., O'Grady, M., Jöns, O., Smith, S., Swift, S., Borgarelli, M., Gavaghan, B., Kresken, J. G., Patteson, M., Ablad, B., Bussadori, C. M., Glaus, T., Kovacević, A., Rapp, M., Santilli, R. A., Tidholm, A., Eriksson, A., Belanger, M. C., Deinert, M., Little, C.

- J., Kwart, C., French, A., Rønn-Landbo, M., Wess, G., Eggertsdottir, A. V., O'Sullivan, M. L., Schneider, M., Lombard, C. W., Dukes-McEwan, J., Willis, R., Louvet, A. and DiFruscia, R. 2008. Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *J. Vet. Intern. Med.* **22**: 1124-1135.
- [106]. Fujimoto, S. 1994. Effects of pimobendan, its active metabolite UD-CG 212, and milrinone on isolated blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.* **265**: 159-166.
- [107]. Fujimoto, S. and Matsuda, T. 1990. Effects of pimobendan, a cardiotonic and vasodilating agent with phosphodiesterase inhibiting properties, on isolated arteries and veins of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**: 1304-1311.
- [108]. Verdouw, P. D., Hartog, J. M., Duncker, D. J., Roth, W. and Saxena, P. R. 1986. Cardiovascular profile of pimobendan, a benzimidazole-pyridazinone derivative with vasodilating and inotropic properties. *Eur. J. Pharmacol.* **126**: 21-30.
- [109]. Duncker, D. J., van Dalen, F. J., Hartog, J. M., Lamers, J. M., Rensen, R. J., Saxena, P. R. and Verdouw, P. D. 1986. Usefulness of pimobendan in the treatment of heart failure. *Arzneimittelforschung.* **36**: 1740-1744.