

ネコの血中心房性ナトリウム利尿ペプチド  
測定に関する基礎的・臨床的意義の検討

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

平島 康博

伴侶動物内科学Ⅱユニット

指導教員 准教授 堀 泰智

2018 年度

## 目次

凡例	…3
緒言	…4
第1章 ネコにおける血中心房性ナトリウム利尿ペプチドアッセイ系の基礎的解析	
1. はじめに	…7
2. 材料および方法	…10
3. 結果	…13
4. 考察	…16
5. 小括	…19
第2章 血行動態がネコ血漿 ANP 濃度に与える影響	
1. はじめに	…20
2. 材料および方法	…22
3. 結果	…24
4. 考察	…26
5. 小括	…29

### 第3章 心房性ナトリウム利尿ペプチドを用いた心筋症猫の診断精度の解析

1. はじめに	…30
2. 材料および方法	…32
3. 結果	…36
4. 考察	…45
5. 小括	…50
総括	…51
謝辞	…55
引用文献	…56

## 凡例

ANP : 心房性ナトリウム利尿ペプチド

BNP : B型ナトリウム利尿ペプチド

NT-proANP : N末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド

NT-proBNP : N末端 proB型ナトリウム利尿ペプチド

E波 : 僧帽弁拡張早期血流速度

HCM : 肥大型心筋症

LA/Ao比 : 左心房径/大動脈径比

ROC : 受信者動作特性

CV値 : 変動係数

## 緒言

心筋症は様々な原因によって心筋の機能障害が現れる疾患であり、原因に基づいて一次性心筋症と二次性心筋症に大別される [21,22]。一次性心筋症は原因が特定されておらず、いずれの先天的・後天的心疾患にも分類されない心筋異常と定義されている。また、一次性心筋症は肥大型心筋症 (HCM)、拘束型心筋症、拡張型心筋症、不整脈原性右室心筋症、未分類型心筋症の 5 つに分類されており、ネコでは HCM ならびに拘束型心筋症の発生が多いと報告されている [55, 59]。ネコの HCM の原因としては  $\beta$  ミオシン重鎖、トロポニン T、 $\alpha$  トロポミオシンなど 7 種類の遺伝子の異常が推測されているが、決定的な因子は明らかにされていない [37, 48]。一方、二次性心筋症は全身性疾患や代謝性疾患 (高血圧症や甲状腺機能亢進症など)、栄養性疾患 (タウリン欠乏など)の結果として心筋障害が発生し、これらの原因が特定された場合に分類される。HCM は心室壁の肥厚 ( $\geq 6.0$  mm)と心室内腔の狭小化を伴い、低下した心室拡張能を特徴とする心筋症である [25]。一方、拘束型心筋症の特徴は心室拡張容積や心室壁厚、心筋の収縮能は概ね正常に保たれているが、拡張能が障害されており心室への血液流入が障害されていることである [25]。これらの心筋症は進行すると心不全による呼吸困難や血流停滞による大動脈血栓塞栓症を引き起こし [4,22,23]、中央生存期間は心不全猫で 563 日、血栓塞栓症の猫では 184 日と報告されている [60]。これらのことから、心不全を発症した心筋症猫の予後は比較的悪いことが伺える。

一般的に、心筋症は心エコー図検査の M-mode 法を使用した壁厚の計測や、ドプラー法を用いた僧帽弁血流速波形、組織ドプラー、2D ストレインなどから診断されている。しかし、心エコー図検査には高額な機器が必要であり、高度な技術を要するた

め、ネコにおける心筋症の早期診断は依然として困難であり、心不全を発症してから診断されるケースも少なくない。従って、安価で簡便に心筋症を検出できる検査法の確立が求められる。

バイオマーカーとは血液や尿、漏出液などの液体中に含まれるタンパク質、ホルモン、酵素等の物質を指す用語であり、アメリカ国立衛生研究所は「バイオマーカーとは、通常の生物学的反応、病理学的反応、もしくは治療に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される項目」と定義している。獣医療においても、血糖値やクレアチニンを始めとし、様々なバイオマーカーが臨床現場で利用されている。この中で、心臓バイオマーカーとは心臓で産生され、血中に分泌・放出される蛋白質やホルモンを指し、近年では心房性ナトリウム利尿ペプチド (Atrial Natriuretic Peptide; ANP)やB型ナトリウム利尿ペプチド (B-type Natriuretic Peptide; BNP)、心筋トロポニンのアッセイ系が確立されている。ナトリウム利尿ペプチドは生理学的作用としてナトリウム利尿ならびに血管拡張作用を持つペプチドホルモンであり、ナトリウム利尿ペプチドには3つのサブタイプ(ANP, BNP, CNP)が知られている [61]。この中で、ANPは28アミノ酸からなり、主に心房筋の分泌顆粒にプレホルモンとして恒常的に貯蔵されている。心房筋が伸展するとプレホルモンがプロセッシングを受けて、生理活性を持つANPと生理活性を持たないN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド(NT-proANP)が即座に血中に放出される [3, 43, 50, 61, 62]。血中のANPはナトリウム利尿ペプチド受容体に結合するとグアニルシクラーゼを介してcGMPが産生され、生理作用を発現すると共に分解される [61]。ANPの血中半減期は1~4分と比較的早く、動物種差はあまりないと報告されている [61, 65]。しかし、ネコにおけるANPアッセイ系の基礎的有用性は十分に明らかではなく、心筋症猫の診断を目的としたANPア

アッセイは未だ確立されていない。

過去の報告では、イヌの血中 ANP 濃度は急性容量負荷による肺動脈楔入圧の上昇に一致して顕著に上昇し、肺動脈楔入圧と強く相関することが明らかになっている [31]。また、心房ペーシングによって誘発した急性心不全モデルの豚において、血中 ANP 濃度は左心房圧の急激な上昇に一致して増加し、ペーシング中止後の左心房圧の低下に伴って減少することが示されている [58]。これらのことから、ANP は心不全の病態の中でも左心房への負荷を強く反映する心臓バイオマーカーであると推察される。近年ではヒトを始めイヌ・ネコにおいて、ANP や BNP の血中濃度が心不全の重症度に関連して上昇しており [2, 54, 68]、僧帽弁閉鎖不全症犬の血中 ANP 濃度は左心房サイズと有意に相関することが報告されている [2, 34]。これらの結果は、血中 ANP 濃度の測定は慢性心不全の診断や重症度評価に加えて、うっ血兆候 (左心房拡大)を知る手掛かりになることを示唆している。しかし、心筋症が大多数を占めるネコにおいて、ANP の臨床的意義(診断価値)は十分に解明されていない。

本研究では、ネコにおける ANP アッセイ法の確立と心筋症猫の早期診断および重症度評価を目的とした診断精度の解明を最終目標とし、以下に示す 3 つの研究を行った。第 1 章では、ヒト ANP アッセイ系がネコ ANP の測定に応用可能かどうかを精査するために、*in vitro* 試験を通して ANP アッセイ系の基礎的解析を行うと共に、ANP の測定結果に影響を与える可能性のあるサンプルの採血方法や保存方法などの取扱法について精査した。第 2 章では、血中 ANP 濃度に対する血行動態の影響を精査するために、全身麻酔下の健康猫の血圧と血中 ANP 濃度の関係を解析した。第 3 章では、心筋症猫において血中 ANP 濃度を測定し、ANP を用いた心筋症の診断ならびに重症度評価の診断精度を解析した。

## 第1章

### ネコにおける血中心房性ナトリウム利尿ペプチドアッセイ系の基礎的解析

#### 1. はじめに

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)は主に心房筋に発現しているペプチドホルモンであり、ネコの心房筋で産生された後、血中に放出されるホルモンである [8, 9, 61]。主な作用としては血管拡張およびナトリウム利尿、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の阻害などが知られている[8, 9, 61]。本ホルモンは単一の遺伝子が preproANP と呼ばれる前駆体タンパク質をコードしている [9]。これはプロホルモンであり、翻訳後はプロセッシングを受けて proANP として心房筋細胞内の分泌顆粒に貯蔵されている [41]。その後、心房壁の伸展刺激に応答して、proANP が生理活性を持たない NT-proANP および生理活性を持つ C 末端断片の ANP に切断されて血中に放出される [9,41, 61]。

現在までに報告されているイヌ・ネコの心臓バイオマーカーには ANP、NT-proANP および N 末端 proB 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP)などが含まれ、イヌおよびネコの心疾患の診断に広く臨床応用されている [33, 53, 54, 57, 72, 73]。心疾患犬では血漿 ANP 濃度が増加しており、心不全の重症度および予後を反映することが知られている [27, 28, 53, 57]。同様に、ネコでは血漿 ANP および NT-proANP 濃度が心筋症の重症度に一致して増加している [33, 72, 73]。Zimmering らは、様々な心筋症猫を対象に研究を行い、左心房拡大のみられる猫では血中 NT-proANP 濃度が上昇しており、うっ血性心不全を発症している猫では血中 NT-proANP 濃度が顕著に上昇することを報告している [72, 73]。さらに、ANP 分泌を刺激する様々な因子の中で、心房の伸展 (左心房の拡張)



大)は主な要因であると推察される [2, 8, 9, 20, 31, 33, 61]。実際に、健康猫を用いた基礎研究において、血中 ANP 濃度は急速輸液による左心房圧の上昇に一致して顕著に上昇し、左心房圧と強く相関することが報告されている [33]。しかし、ネコにおける ANP アッセイ系の基礎的有用性は不明であり、心筋症猫の診断を目的とした ANP アッセイは未だ確立されていない。

臨床現場においてナトリウム利尿ペプチドを心不全の指標として使用する際に、血漿サンプルの採取法、サンプルの保存温度および保存期間などの条件は測定値に影響する可能性がある [16, 18]。これにはメタロプロテアーゼである neutral endopeptidase 24.11 の作用が影響している可能性がある。Neutral endopeptidase 24.11 はナトリウム利尿ペプチドを分解するが、この酵素を阻害すると ANP の分解が抑制されることが明らかとなっている [15, 37, 67]。In vitro の研究では、プロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンを添加した血漿では ANP の減少を有意に阻害した [13]。このため、採取した血漿サンプルを測定のために外部の検査機関に送付する際には、アプロチニンを血液サンプルに添加することが推奨されている。さらに、アプロチニン以外にも、血漿サンプルの取り扱い方が ANP の測定結果に影響を及ぼす可能性があり、正確な ANP 測定結果を得るためにはサンプル処理に関する要因を明確にしておく必要がある。例えば、イヌの血清 NT-proBNP 濃度は凍結すると増加したが、その後、室温で保存すると 24 時間後には有意に減少した [16]。また、ネコの血清サンプルを室温で保存した場合、プロテアーゼ阻害薬を添加した血漿サンプルに比べて NT-proBNP 濃度は 24~120 時間後まで継時的に有意に低下した [18]。これらのことは、心臓バイオマーカーの測定結果はサンプル採取法および凍結温度・保存期間の影響を受けることを示唆している。しかし、我々の知る限り、ネコの血漿サンプルにおいて ANP の保存安定

性を調べた研究はこれまでに報告されていない。従って、第 1 章では *in vitro* 試験においてネコ血漿 ANP のアッセイ系の信頼性を確認すると共に、保存安定性に関する影響を様々な取り扱い条件下 (サンプル採取法、保存法および凍結温度) で評価した。

## 2. 材料および方法

### 1) 動物

血漿 ANP 濃度の希釈試験を実施するために、血漿 ANP 濃度が高いと予測された猫を用いた。猫は HCM の検査のために紹介来院した 17 歳のラグドール (体重 3.3kg、雄)であった。血液サンプルの採取に際して、猫のオーナーにはインフォームドコンセントを行い、了承を得た。

また、血漿 ANP 濃度の保存安定性を評価するために、北里大学獣医学部で飼養管理している健康な 5 頭の雑種猫 (雄 2 頭および雌 3 頭; 体重 2.5–5.0kg)を用いた。これらの供試猫は個別のケージで、自由飲水と市販のドライフードを与えて飼養管理していた。研究プロトコールは、北里大学獣医学部の動物実験・倫理委員会のガイドラインに従って設計し、研究は同委員会の承認を得て実施した (承認番号 14-161)。

### 2) プロトコール

#### 2.1) 希釈試験

HCM 猫の頸静脈から静脈血を採取し、血液はアプロチニン採血管 (Neotube, EA0205-1, NIPRO, 東京, 日本)に分注した。採取した血液は直ちに  $1,500\times g$  で遠心分離し、採取した血漿を直ちに  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存した。血漿および標準試薬は生理食塩水 (0.9%NaCl)を用いて以下の通りに 2 倍階段希釈した ;  $\times 1$ ,  $\times 2^{-1}$ ,  $\times 2^{-2}$ ,  $\times 2^{-3}$ ,  $\times 2^{-4}$ ,  $\times 2^{-4}$ ,  $\times 2^{-5}$ ,  $\times 2^{-6}$ ,  $\times 2^{-7}$ 。サンプル中の ANP の吸光度 (1 分当たりのカウント数)を求め、標準曲線から血漿 ANP 濃度を計算した。

#### 2.2) 保存安定性の評価

保存安定性を評価するために以下に示す 2 つの実験を行った。室温での ANP の試験管内安定性を評価するために、5 匹の健康な猫の頸静脈から静脈血 (6–8 mL) を採取し、アプロチニン採血管 (Neotube, EA0205-1) およびプレーンチューブに全血を分注した。各チューブは直ちに遠心分離し、上清を 5 本のマイクロチューブに分注した (0.3–0.4 mL/マイクロチューブ)。1 本目の上清 (血漿または血清) はベースライン (0 時間) として直ちに -70°C で保存した。残りの 4 本のチューブはそれぞれ室温 (27°C) で 1, 3, 6, 12 時間静置した後、-70°C で保存した。その後、血漿 ANP 濃度は外部検査センターで測定した (FUJIFILM Monolith, 東京, 日本)。

次に、異なる保存温度が試験管内での ANP の安定性に影響することを評価するために、上記と同様に猫から頸静脈穿刺によって 6–8 mL の血液を採取した。採取した全血は直ちにアプロチニン採血管 (Neotube, EA0205-1) へ分注した。採血管は直ちに遠心分離し、採取した血漿を 4 本のマイクロチューブ (0.3–0.4 mL/マイクロチューブ) に分注した。一本目のマイクロチューブはベースライン (0 日目) として直ちに -70°C で保存した。残りの 3 本のマイクロチューブはそれぞれ -70°C で 1 日、7 日または 14 日間保持した。同様の手技により、-20°C または 4°C で保存したサンプルを用意した。その後、血漿 ANP 濃度は外部検査センターで測定した (FUJIFILM Monolith)。採血の間隔は少なくとも 7 日間を設け、無麻酔下で合計 3 回の採血を行った。

### 3) ANP 濃度の測定

血液サンプルはアプロチニン (1,000 kU) と EDTA-2Na (2.5 mg) を含む採血管に 2 mL ずつ分注した。各管のアプロチニン濃度は 500 kU/mL に調整した。採取した血液は 1,500×g で遠心分離 (10 分間、4°C) した。収集した上清の血漿 ANP 濃度は外部検査セ

ンターで測定した (FUJIFILM Monolith, 東京, 日本)。血漿 ANP 濃度はヒト  $\alpha$ -ANP キットを用いて、化学発光酵素免疫測定法によって測定した (Shionoria-ANP, Shionogi, 大阪, 日本)。このアッセイは、ヒト C 末端 ANP 濃度を測定するために設計されたもので、マウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体を使用している。全ての測定は 2 回実施し、平均値を解析に用いた。各サンプルについて吸光度を求め、標準曲線から ANP 濃度を算出した。平均 ANP 濃度が  $67.4 \pm 1.0$  pg/mL の時のアッセイ内変動係数 (CV 値)は 1.5%であり、 $83.6 \pm 2.0$  pg/mL の時のアッセイ間 CV 値は 2.5%であった。

#### 4) 統計分析

データは平均値  $\pm$  標準偏差として表記した。試験管内での保存安定性試験のために、各条件についてのベースライン値からの血漿 ANP 濃度の変化率を、一因子分散分析を用いて解析した。同様に、2 元配置分散分析を使用して、血清とアプロチニン血漿の継時的な ANP 濃度の変化率、および異なる保存温度 ( $-70^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ および  $4^{\circ}\text{C}$ ) 間の ANP 濃度の継時的な変化率を解析した。ベースラインと各条件下での ANP 値の有意差は、Tukey 多重比較検定で評価した。 $P < 0.05$  の場合を有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 1) 希釈試験

心不全を有する猫の血漿 ANP 濃度は 230 pg/mL であった。2 倍階段希釈した時の血漿 ANP 濃度は、 $\times 2^{-1}$  で 113.6 pg/mL、 $\times 2^{-2}$  で 58.2 pg/mL、 $\times 2^{-3}$  で 30.0 pg/mL、 $\times 2^{-4}$  で 14.4 pg/mL、 $\times 2^{-5}$  で 8.8 pg/mL、 $\times 2^{-6}$  で 7.2 pg/mL、 $\times 2^{-7}$  で 4.7 pg/mL となった。さらに、ネコ血漿サンプルとヒト ANP 標準試薬との間でパラレルリズムが確認され、ヒト標準試薬とネコ血漿サンプルにおいて吸光度は同じ傾きで変化した (図 1)。

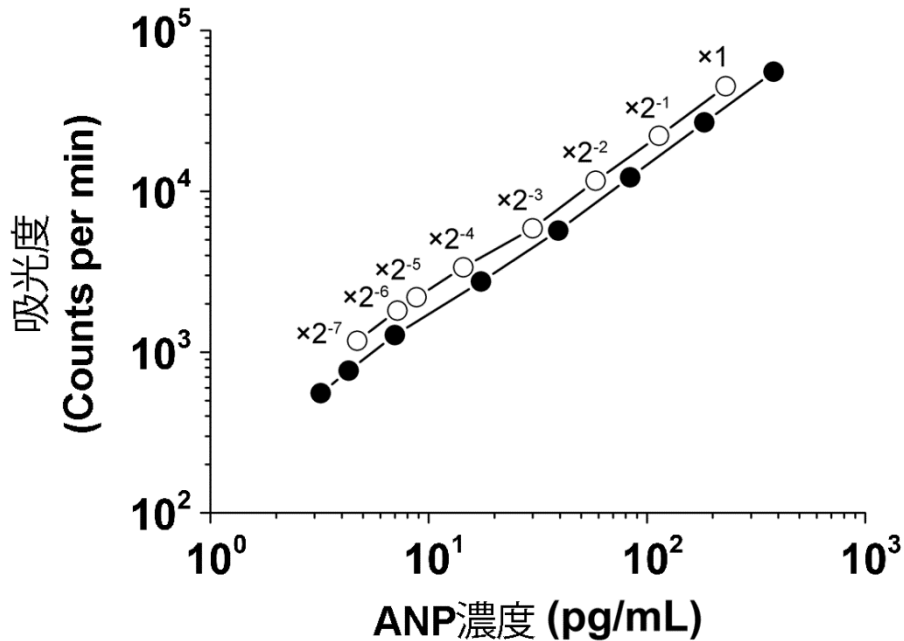


図 1. 2 倍階段希釈したヒト ANP 標準試薬 (●)とネコ血漿サンプル (○)のパラレルリズム

血漿は肥大型心筋症の精査のために来院した 17 歳のラグドール (雄)からサンプリングした。

## 2) 室温保存した血漿および血清サンプル中の ANP 濃度の変化

アプロチニンを含まないネコの血液サンプル (血清) では、経時的に ANP 濃度の有意な低下を示した ( $P < 0.05$ )。血清 ANP 濃度のベースライン (0 時間) からの減少率は、1, 3, 6, 12 時間後でそれぞれ  $17.2 \pm 1.3\%$ 、 $54.7 \pm 5.8\%$ 、 $77.4 \pm 11.9\%$ 、 $82.4 \pm 13.6\%$  であった (図 2)。一方、アプロチニンを含む血液サンプル (血漿) の ANP 濃度は継時的に変化したが、ベースラインから僅かに減少しただけであった。血漿 ANP 濃度のベースライン (0 時間) からの減少率は、それぞれ  $4.6 \pm 2.2\%$ 、 $6.3 \pm 2.2\%$ 、 $6.2 \pm 3.4\%$ 、 $3.6 \pm 2.1\%$  であった (図 2)。血清 ANP 濃度の減少率は、血漿 ANP 濃度の減少率より有意に大きかった ( $P < 0.001$ )。

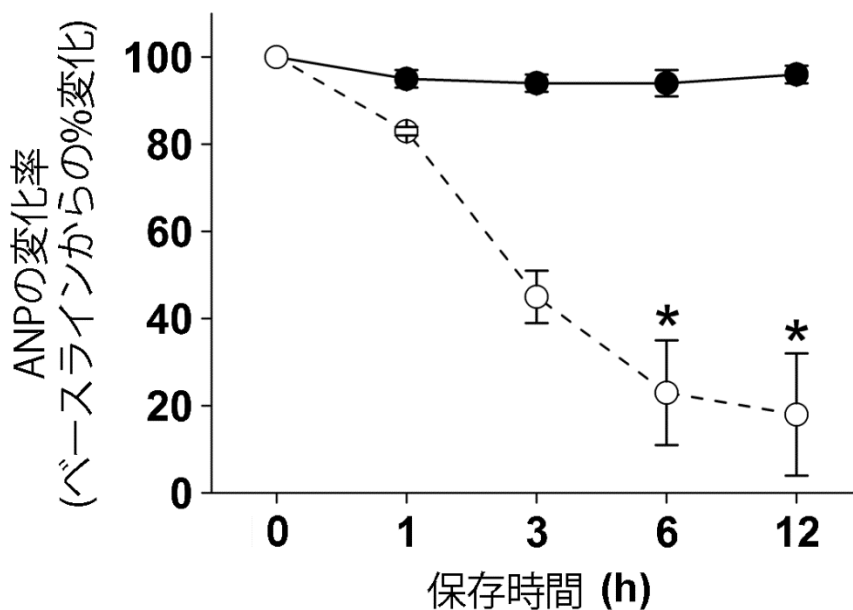


図2. 室温保存した血漿および血清サンプル中の ANP 濃度の継時的変化率

結果は平均値 ± 標準偏差で示した。

室温 (27°C) で血清 (○) および血漿 (●) サンプルを 12 時間静置した時のベースライン値からの ANP 濃度の変化率を示した ( $n = 5$ )。\*  $P < 0.05$  vs ベースライン (0 時間)

### 3) 異なる温度で保存した時の血漿 ANP 濃度の変化

-70°Cで保存した血漿サンプルの ANP 濃度は、14 日後もベースライン (0 日目)と同等であった (図 3)。同様に、-20°Cで保存した血漿サンプルの ANP 濃度は、7 日後までベースラインと同等であったが、14 日後にはベースライン値の  $87.0 \pm 1.3\%$  に有意に低下した ( $P < 0.01$ , 図 3)。一方、4°Cで保存した血漿サンプルの ANP 濃度は、1 日後にベースライン値の  $93.3 \pm 1.2\%$  に減少し、7 日後および 14 日後にはそれぞれベースライン値の  $57.6 \pm 6.9\%$  および  $18.0 \pm 3.0\%$  に有意に低下した ( $P < 0.001$ , 図 3)。

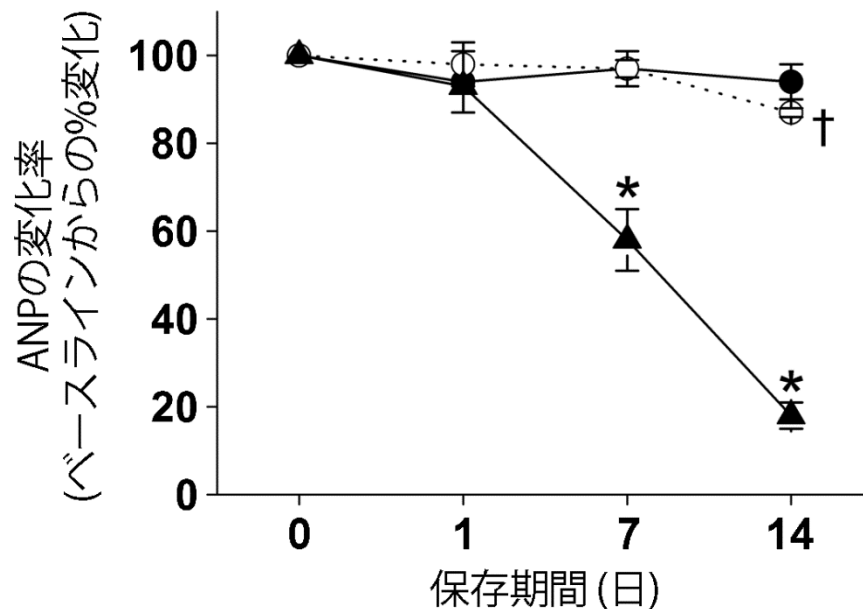


図3. 異なる温度で保存した時の血漿ANP濃度の継時的変化率

結果は平均値±標準偏差で示した。

サンプルを4°C (▲)、-20°C (○)および-70°C (●)で保存した時のベースライン値からの継時的な血漿ANP濃度の変化率を示した (n = 5)。

†  $P < 0.01$  vs ベースライン (0 日), \*  $P < 0.001$  vs 0 日.



#### 4. 考察

過去の研究では、ヒト ANP 抗体を使用してネコの血漿 ANP 濃度が測定されており、ヒト ANP アッセイ系はネコ ANP 濃度の測定に利用できる可能性が示唆されている [33, 42]。また、ネコ ANP のアミノ酸配列は、ヒト、イヌ、ウシ、ウマの ANP と相同性が高いことが報告されている (それぞれ 72%、76%、76%、および 80%の相同性) [9]。これらのことから、ヒト ANP 抗体はネコ ANP に親和性を示すことが推察されるが、ヒト ANP アッセイ系を応用したネコの ANP 測定に関する基礎的な情報はほとんどない。本研究では、マウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体を用いた化学発光酵素免疫測定法によりネコの ANP を測定した。アッセイ内およびアッセイ間 CV 値はそれぞれ 1.5%および 2.5%であり、さらに、ネコの血漿サンプルとヒト標準試薬との間でパラリズムが確認された。これらの結果は、マウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体がネコ ANP に対して親和性を有し、臨床応用が可能であることを示している。

ANP 測定に使用される血液サンプルは、通常、プロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンを添加し、保存される。過去の研究において、アプロチニンを含まないヒト血漿を室温で静置 (3 時間)すると血漿サンプル中の ANP 濃度は有意に低下したが、アプロチニンを含む血漿サンプルでは低下しなかった [13]。同様に、アプロチニンはネコの血漿サンプル中のナトリウム利尿ペプチドの分解を抑制することが報告されている [13, 18, 26]。Connolly らは、アプロチニンを含まないネコ血漿サンプルを室温で 48 時間静置すると NT-proBNP 濃度は低下したが、アプロチニンを添加することで NT-proBNP 濃度の低下を有意に減少することを示している [18]。これにはナトリウム利尿ペプチドを分解するメタロプロテアーゼ (neutral endopeptidase 24.11)の作用が影響していると推察される [15, 37, 67]。しかし、アプロチニンが室温保存のネコ血漿サ

サンプルにおいて ANP 濃度の安定性に影響するかどうかは不明であった。本研究では、アプロチニンを含まない血清を室温で静置した場合、12 時間後には ANP 濃度が 80% 以上減少した。一方、アプロチニンを添加した血漿サンプルでは ANP の分解が有意に抑制された。アプロチニンはプロテアーゼ阻害剤であり、neutral endopeptidase 24.11 の作用を阻害することで ANP の分解を抑制したと考えられる。これらの結果はネコの血漿 ANP 濃度を測定する際には、血液にアプロチニンをルーチンに添加する必要があることを示唆している。

さらに、臨床現場では血漿サンプルを測定に供するまでに冷蔵庫または冷凍庫で数日間保存することがある。ヒト血漿を用いた研究では、血漿へのアプロチニンの添加は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した血漿 BNP の分解を最大で 3 ヶ月間も抑制した [26]。一方、アプロチニンを添加していない血漿中の BNP 濃度は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存しても 1 日後には 70% 以上も減少し、2~4 ヶ月後には 50% 以上も減少することが明らかになっている [50]。しかし、ネコ血漿サンプルにおける ANP の長期安定性に影響する保存条件はこれまで解明されていない。我々の研究では、アプロチニンを添加した血漿サンプルを $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した場合には ANP 測定値は 14 日後にも有意な変化を示しておらず、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した場合には 7 日間後まで有意な変化を示していなかった。一方、 $4^{\circ}\text{C}$ で 7 日間保存した血漿サンプルの ANP 測定値はベースライン値の 57.6%に低下していた。これらのことから、ネコ血漿サンプルは直ちに $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結し、採取後は 7 日以内に測定することが推奨される。

本研究にはいくつかの制約がある。他のペプチドホルモンや蛋白質、溶血や黄疸、高脂血症などの ANP 測定値への影響は明らかになっていない。従って、ネコ ANP とマウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体との親和性に相互作用する未知の交絡因子が

結果に影響する可能性がある。また、ネコの血漿 ANP 濃度は腎機能、血統、体重、年齢、および性別などの他の要因によって変化する可能性がある。これらのことを精査するために、更なる研究が必要である。

我々の研究から、マウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体がネコ ANP に対して親和性を有することが明らかとなった。また、ネコ ANP を測定する際には採血時の血液サンプルにアプロチニンの添加が必要であり、ネコの血漿サンプルは-20℃以下で直ちに保存し、7日以内に測定する必要があることが明らかになった。これらの結果は、心不全の猫を評価するために血漿 ANP 濃度を測定する場合は、血液サンプルの適切な取扱いが重要な因子であることを示唆している。

## 5. 小括

第1章ではヒト ANP アッセイ系を応用したネコ血漿 ANP 測定の信頼性を評価すると共に、異なる取り扱い条件下における ANP の試験管内安定性を精査した。研究では健康な雑種の成猫 (5 頭) および HCM の猫 (1 頭) を対象とした。血漿 ANP 濃度は外部検査センターで、化学発光酵素免疫測定法によって測定した。HCM 猫の血漿サンプルを 2 倍階段希釈し、ヒト ANP 標準試薬とのパラレリズムを評価した。試験管内安定性を精査するために、健康猫のアプロチニン血漿または血清を室温で 12 時間静置した。同様に、血漿サンプルを  $-70^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、または  $4^{\circ}\text{C}$  で 14 日間保存した。アッセイ内およびアッセイ間 CV 値は 1.5% および 2.5% であった。2 倍階段希釈した HCM 猫の血漿サンプルはヒト ANP 標準試薬と平行を示し、パラレリズムが確認された。室温で 12 時間静置したサンプルでは血清 ANP 濃度が  $82.4 \pm 13.6\%$  も減少したが、アプロチニン血漿では ANP の減少は有意に抑制された。また、血漿 ANP 濃度は  $-20^{\circ}\text{C}$  では 7 日間、 $-70^{\circ}\text{C}$  では 14 日間安定していたが、 $-20^{\circ}\text{C}$  では 14 日後に  $87.0 \pm 1.3\%$  に低下し、 $4^{\circ}\text{C}$  では 14 日後に  $18.0 \pm 3.0\%$  に著しく低下した。これらの結果は、血液サンプルにはアプロチニンをルーチンに添加すべきであり、血漿サンプルを直ちに凍結すべきであることを示唆している。

## 第2章

### 血行動態がネコ血漿 ANP 濃度に与える影響

#### 1. はじめに

ANP はうっ血性心不全に伴う左心房の伸展刺激に反応して血中へ分泌されるホルモンである。実際に、健康猫を用いた基礎研究において、血中 ANP 濃度は急速輸液による左心房圧の上昇に一致して顕著に上昇し、左心房圧と強く相関することが報告されている [33]。また、ヒトの心不全患者においても、血中 ANP 濃度は左心房圧の上昇と一致しているが、BNP は左心室拡張末期圧の上昇と一致していることが報告されている [71]。従って、ANP の主な分泌刺激は左心房の拡大であると考えられる。

この他にも、心臓バイオマーカーは腎機能や血圧など様々な生理学的要因の影響を受けることが示唆されている [11, 40]。例えば、Lalor らは重度な慢性腎疾患猫では健康猫よりも NT-proANP や NT-proBNP の血漿濃度が高値を示すことを報告している [40]。同様に、心疾患犬の血中 NT-proBNP 濃度は血中クレアチニン濃度と有意な相関を示し、腎機能の影響を受けることが報告されている [11]。これらのことから、心不全以外にも血中 ANP 濃度の調整に影響する因子が存在している可能性がある。特に、ネコは非常に神経質な動物であることは広く知られており、健康猫を用いた研究において、動物病院で計測した収縮期血圧は自宅と比べて 17.6 mmHg も上昇している [6]。また、高血圧症の猫では血中 NT-proBNP 濃度が著増していることが報告されている [40]。これらのことから、ネコの動脈圧は血漿 ANP 濃度に影響する一因であると推察される。しかし、これまでにネコの血行動態と血漿 ANP 濃度の関係を精査した報告はない。従って、第2章では健康猫を用いて全身麻酔を行い、麻酔前後での血漿 ANP

濃度と全身血圧の関係を精査した。

## 2. 材料および方法

### 1) 動物

麻酔前後における血漿 ANP 濃度の変化を評価するために、北里大学獣医学部で飼養管理している健康な5頭の雑種猫 (雄2頭および雌3頭; 体重2.5–5.0 kg)を用いた。これらの猫は個別のケージで飼育され、自由飲水と市販のドライフードを与えて飼育していた。研究プロトコールは、北里大学獣医学部の動物実験・倫理委員会のガイドラインに従って設計し、研究は同委員会の承認を得て実施した (承認番号 14-161)。

### 2) プロトコール

血漿 ANP 濃度に対する全身麻酔の影響を評価するために、供試猫に全身麻酔を実施し、鎮静前と全身麻酔の30分後に採血を実施した。本研究は第1章で行った研究の約4週間後に実施した。猫はブトルファノール酒石酸塩 (0.2 mg/kg、IV)で鎮静した後、プロポフォール (6 mg/kg、IV)により麻酔誘導し、気管内挿管して右側横臥位に保定した。麻酔は2.0%イソフルランと酸素で維持し、自発呼吸を維持した。心拍数、呼吸数、パルスオキシメトリーで測定した酸素飽和度と終末呼気二酸化炭素濃度をモニターした (COLIN BP-608, COLIN, 東京, 日本)。収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧はオシロメトリック法とフォトプレチィスモグラフィ法 (光電脈波)を併用した血圧測定機を用いて測定した (BP-100, FUKUDA M-E, 東京, 日本)。血圧測定時は猫を右側横臥位に保定し、前肢の前腕部にカフを設置した。

### 3) 血漿 ANP 濃度の測定

血液は頸静脈から採取し、血液サンプルはアプロチニン (1,000 kU)を含む採血管

(Neotube, EA0205-1)に 2 mL ずつ分注した。各管のアプロチニン濃度は 500 kU/mL に調整した。採取した血液は直ちに 1,500×g で遠心分離 (10 分間、4°C)し、血漿をマイクロチューブに分注した。血漿 ANP 濃度は外部検査センターで測定した (FUJIFILM Monolith)。血漿 ANP 濃度はヒト  $\alpha$ -ANP キットを用いて、化学発光酵素免疫測定法によって測定した (Shionoria-ANP)。全ての測定は 2 回実施し、平均値を解析に用いた。各サンプルについて吸光度を求め、標準曲線から ANP 濃度を算出した。

#### 4) 統計分析

データは平均値  $\pm$  標準偏差として表記した。paired  $t$  検定を使用して、麻酔前および麻酔中に測定した血漿 ANP 濃度および他の血行動態に関するパラメーターを比較した。回帰式と相関係数 ( $r$ )を計算し、麻酔前と麻酔中の両方で得られた血漿 ANP 濃度と血行動態に関するパラメーターとの相関性を解析した。 $P < 0.05$  の場合を有意差ありとした。



### 3. 結果

麻酔前後における血行動態の変化を図4に示した。心拍数は麻酔前に比べて、全身麻酔の30分後には有意に低下した(麻酔前:  $191 \pm 28$  bpm vs 麻酔後:  $154 \pm 18$  bpm,  $P < 0.05$ )。同様に、収縮期血圧 ( $144 \pm 26$  mmHg vs  $83 \pm 6$  mmHg,  $P < 0.001$ )、平均血圧 ( $116 \pm 28$  mmHg vs  $59 \pm 8$  mmHg,  $P < 0.001$ )、拡張期血圧 ( $95 \pm 30$  mmHg vs  $45 \pm 8$  mmHg,  $P < 0.01$ )が有意に低下した。

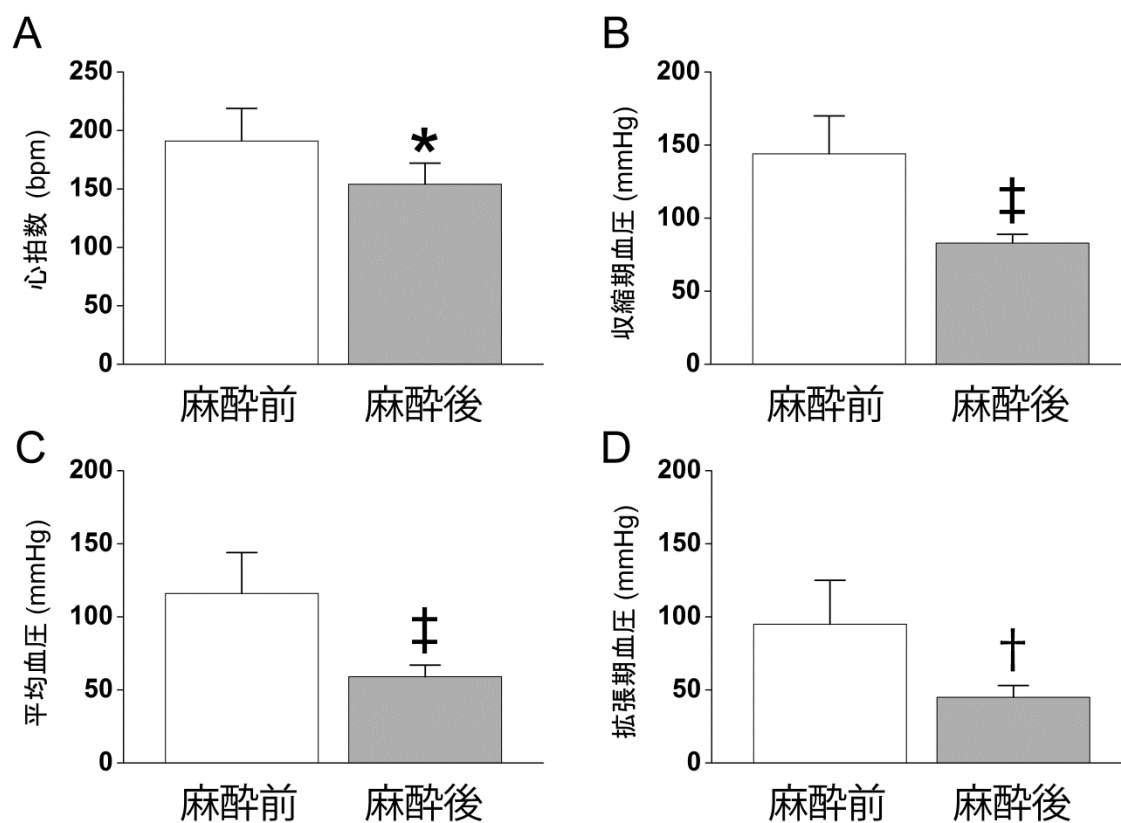


図4. 麻酔前後における血行動態の変化

結果は平均値±標準偏差で示した。

図はそれぞれ心拍数(A)、収縮期血圧(B)、平均血圧(C)、拡張期血圧(D)を示している (n = 5)。\*  $P < 0.05$  vs 麻酔前, †  $P < 0.01$  vs 麻酔前, ‡  $P < 0.001$  vs 麻酔前。

麻酔前の血漿 ANP 濃度は  $76.9 \pm 59.9$  pg/mL であったが、全身麻酔によって急速かつ有意に  $40.3 \pm 30.6$  pg/mL まで減少した ( $P < 0.05$ , 図 5)。また、血漿 ANP 濃度は収縮期血圧 ( $r = 0.59$ ,  $r^2 = 0.35$ ,  $P = 0.025$ )ならびに平均血圧 ( $r = 0.56$ ,  $r^2 = 0.31$ ,  $P = 0.038$ ) と有意に相関していたが、心拍数 ( $r = 0.50$ ,  $r^2 = 0.25$ ,  $P = 0.066$ )および拡張期血圧 ( $r = 0.49$ ,  $r^2 = 0.24$ ,  $P = 0.073$ )との相関性は認められなかった。

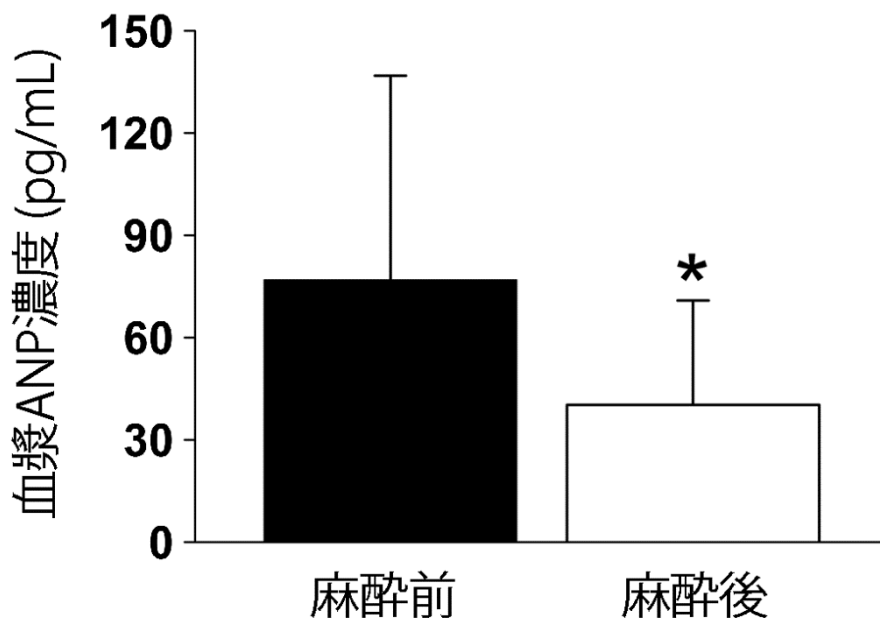


図5. 麻酔前後の全身血圧が健康猫の血漿ANP濃度に及ぼす影響

結果は平均値±標準偏差で示した (n = 5)。

ANP; 心房性ナトリウム利尿ペプチド。\*  $P < 0.05$  vs 麻酔前。

#### 4. 考察

本研究で麻酔薬として使用したプロポフォールやイソフルレンは血行動態へ影響することが知られている[14]。プロポフォールが血圧を低下させる機序には静脈の拡張や交感神経系の抑制などが考えられている。例えば、プロポフォールはイヌの静脈を拡張させることや [5]、ラットの静脈の血管平滑筋を弛緩させることが報告されている [7]。また、プロポフォールがラットの交感神経系を抑制する結果として、血管内容量が増加することも知られている [30]。実際に、ネコでもプロポフォールによって動脈圧が低下する [1]。加えて、イソフルレンはハロゲン化エーテル系の吸入麻酔薬であり、用量依存性にイヌの動脈圧を低下させることや、末梢血管抵抗を減少させることが知られている [47, 52]。また、イソフルレンはネコの心拍数や収縮期血圧を低下させる [56]。本研究ではプロポフォールで麻酔導入し、イソフルレンで麻酔維持した結果、麻酔前と比べて麻酔後の心拍数および動脈圧が有意な低下を示し、過去の報告と一致した変化を示した。本研究では、全身麻酔を用いることで様々な外的要因(緊張や興奮、測定手技、体動など)を最小限にして、血行動態と血中 ANP 濃度の関係を解析することが可能となった。

本研究では血行動態の指標として、オシロメトリック法とフォトプレチィスモグラフィ法(光電脈波)を併用した血圧測定機 (BP100D)を用いて非観血的血圧を測定した。心臓から血液が駆出されると動脈内圧に変化が生じ、この圧変動は末梢動脈に伝達される。これを脈波といい、脈波には圧脈波と容積脈波がある。圧脈波は心拍動に伴う動脈内圧の変化を記録する方法であり、オシロメトリック法は圧脈波から血圧値を決定している [36]。一方、容積脈波は心拍動に伴う血管容積の変化を記録する方法であり、フォトプレチィスモグラフィ法では容積脈波から血圧値を決定している。フォト

プレチィスモグラフィ法は血液が周囲の組織よりもはるかに強く赤外線を吸収するという特性を利用し、赤外線量の変化から皮下組織に分布する微小血管の容積変化を記録して血圧値を決定している [36]。我々は過去に、麻酔下の猫において BP100D を用いて記録した動脈圧が観血的血圧と高い相関性 ( $r = 0.88$ )を示し、平均誤差は小さい (3.4 mmHg)ことを明らかにしている [29]。このことから本研究では麻酔モニターとして BP100D を使用し、非観血的血圧を測定した。

ANP は心房壁の伸展刺激に反応して心房筋から放出されるホルモンである [10, 20]。過去の報告では、血漿 ANP 濃度は虚血性心疾患患者の肺動脈楔入圧と有意に相関しており [45]、イヌの肺動脈楔入圧およびネコの左心房圧とも相関することが知られている [2, 33]。しかし、イヌ・ネコでは腎機能および全身血圧などのいくつかの因子が血漿ナトリウム利尿ペプチド濃度に影響する可能性が示されている [11, 40, 49]。重度の慢性腎疾患を有する猫では NT-proANP や NT-proBNP の血漿濃度は有意に上昇しており、血漿クレアチニン濃度と有意に相関していた [40]。また、高血圧症の猫では血中 NT-proBNP 濃度が著増していることが報告されている [40]。本研究では、全身麻酔によって血漿 ANP 濃度が有意に減少し、収縮期血圧ならびに平均血圧の低下と一致していた。さらに、血漿 ANP 濃度は収縮期血圧ならびに平均血圧と有意な相関を示した。これらのことから全身血圧はネコ血漿 ANP 濃度の調節に影響を与えている可能性が示唆される。

本研究にはいくつかの制約がある。本研究では健康猫を用いて研究を行ったが、心不全猫では異なる反応を示す可能性がある。また、麻酔薬の直接的な薬理学的効果としてネコの ANP 分泌に影響した可能性を否定することはできない。最後に、ネコの血漿 ANP 濃度が腎機能や血統、体重、年齢および性別などの生理学的要因によって

調節されるかどうかは不明である。従って、ネコの血漿 ANP 濃度に影響する要因を  
解明するために、更なる研究が必要である。

我々の研究から、ネコ血漿 ANP 濃度は動脈圧の影響を受けている可能性が明らか  
になった。このことはネコの興奮状態が血中 ANP 濃度に影響することを示唆してい  
る。心不全の猫を評価するために血漿 ANP 濃度を測定する場合は、可能な限り興奮  
させず、落ち着いた状態で採血を行うことが重要である。

## 5. 小括

第2章では全身血圧が血漿 ANP 濃度に及ぼす影響を評価した。研究では健康な雑種の成猫(5頭)を供試し、麻酔前および麻酔中に血漿サンプルを採取した。血液サンプルはアプロチニンを含む採血管に分注し、血漿 ANP 濃度は外部検査センターで、化学発光酵素免疫測定法によって測定した。麻酔中の血圧は非観血法を用いて測定した。麻酔前に比べて、全身麻酔の30分後には心拍数、収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧は有意に低下した。同様に、血漿 ANP 濃度は麻酔によって有意に減少した(麻酔前,  $76.9 \pm 59.9$  pg/mL vs 麻酔中,  $40.3 \pm 30.6$  pg/mL)。さらに、血漿 ANP 濃度は収縮期血圧 ( $r = 0.59, r^2 = 0.35, P = 0.025$ )ならびに平均血圧 ( $r = 0.56, r^2 = 0.31, P = 0.038$ )と有意に相関していた。これらの結果は、全身麻酔または全身血圧はネコの血漿 ANP 濃度に影響を与える可能性があることを示唆している。正確な ANP 測定値を得るためには鎮静剤や麻酔薬を使用せずに安静時の採血を実施すべきである。

### 第3章

#### 心房性ナトリウム利尿ペプチドを用いた心筋症猫の診断精度の解析

##### 1. はじめに

一次性心筋症は機能的または病理学的異常に基づいて、HCM、拘束型心筋症、拡張型心筋症、未分類型心筋症、および不整脈原性右室心筋症の5種類に分けられている。これらのうち、ネコではHCMおよび拘束型心筋症の罹患率が高く、臨床的に頻繁に遭遇する心筋症である [21,22, 60]。さらに、進行した心筋症の猫はうっ血性心不全および血栓塞栓症の発症リスクの高いことが報告されており、これらの猫の予後は不良である [21,22, 60]。従って、心筋症猫の重症度を評価することは心不全治療薬の選択や予後を予測する上で非常に重要なプロセスの1つである。しかし、心筋症猫の重症度評価は胸部 X 線検査や心エコー図検査を用いた画像診断に依存しており、一般開業医にとってはとても困難な作業であることが制約となっている。特に、心エコー図検査は心筋症を診断するための最も一般的で確実な手法であるが、主な制約として比較的高価な機器と専門的で高度な技術を必要とすることが挙げられる。従って、心筋症は依然として見逃されていることが多く、早期発見のための検査法の確立が求められる。

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには ANP をはじめ、BNP および CNP が知られており、獣医療では心疾患を診断するためのバイオマーカーとして ANP や NT-proANP、NT-proBNP が利用されている。この中で、心筋症猫の NT-proANP や NT-proBNP の血中濃度は健康猫に比較して有意に上昇しており [19, 25, 72]、血中 NT-proBNP 濃度は HCM 猫の重症度評価に有用であることが示唆されている [19, 25]。同様に、心筋症の

種類を問わず左心房拡大のみられる猫では血中 NT-proANP 濃度が上昇しており、うつ血性心不全を発症している心筋症猫では血中 NT-proANP 濃度が顕著に上昇している [72, 73]。これらの結果は ANP の測定が心筋症猫の診断や重症度評価に有用であることを示唆している。

ANP は心房筋において産生された後、プロホルモンとして貯蔵され、心房壁の伸張に反応して 2 つのセグメントに切断される。プロホルモンは生物学的な活性を持たない NT-proANP および生物学的活性を持つ ANP に切断され、主に左心房から血液中に放出される [61]。Biondo らは、心不全猫の心房筋では ANP 産生が上昇していることを示している [8, 9]。また、肺動脈楔入圧および左心房圧の上昇はイヌおよびネコにおける血漿 ANP 濃度の増加と一致しており、有意に相関している [32, 33]。これらのことから、血漿 ANP 濃度の測定は心筋症の猫を特定するために有用な検査であると期待される。しかし、ネコにおいて血漿 ANP 濃度を臨床的に評価した研究は少なく [33, 42]、心筋症の重症度を特定するための ANP の診断精度や基準値は不明である。

第 3 章では、心エコー図検査を用いて心筋症と診断した猫において、健康猫と心筋症猫の血中 ANP 濃度を重症度毎に比較すると共に、心筋症の異なる重症度を特定するための血漿 ANP 濃度の診断精度を精査した。



## 2. 材料および方法

### 1) 動物

本研究は前向き多施設研究で実施した。2013年7月から2017年3月の間に酪農学園大学附属動物医療センターを含む全国の10施設(平成動物病院、宮崎大学、エビス動物病院、オノデラ動物病院、うえだ動物クリニック、かたぎ犬猫病院、上野の森動物病院、ベイ動物病院、日本大学)に来院した猫192頭からデータを収集した。猫のオーナーにはインフォームドコンセントを行い、試験参加への了承を得た。

### 2) エントリー基準

猫は静かな診察室で身体検査、心エコー図検査、血液採取を行い、検査時に鎮静剤は使用しなかった。対照猫は健康診断の目的で獣医学生およびクライアントから募集し、身体検査および心エコー図検査に基づいて心疾患のない事を確認した。また、心筋症猫は心エコー図検査によって診断し、研究に供した。無症候性の心筋症猫はクライアントの希望により各施設で健康診断を受け、心エコー図検査の結果に基づいて診断された。液体貯留および血栓塞栓症を発症し、心エコー図検査で心臓の異常を認められた猫は心不全猫と診断した。これらの猫は、初診時の臨床徴候に基づいて検査を実施し、本研究に登録した。臨床的に、心筋症猫は高率に慢性腎疾患を合併していることから、慢性腎疾患を併発している心筋症猫は本研究の対象とした。これらの対象猫は過去のANPの測定結果または心筋症の他の客観的検査の結果に基づいて、事前に選択されていない。

心筋症猫は左心房拡大を伴わない無症候群; 左心房拡大なし群、左心房拡大を伴う無症候群; 左心房拡大あり群、心不全群の3群に分けた。心エコー図検査に基づいて

左心房径大動脈径 (LA/Ao)比が  $>1.5$  の猫は、左心房拡大とした [72]。うっ血性心不全は呼吸困難に加えて胸部 X 線検査から肺水腫または胸水を認めた場合に診断した。血栓塞栓症は急性の四肢不全麻痺に加え微弱または触知不能の脈拍、四肢のチアノーゼ、冷感などの臨床徴候を認め、超音波検査において動脈血流が消失している場合とした [64]。

### 3) 除外基準

全身性高血圧 (収縮期血圧  $\geq 180$  mmHg)の猫は除外した [12]。さらに、糖尿病および甲状腺機能亢進症はヒトの血中 ANP 濃度に影響することが知られている [39, 44]。ネコにおいて同様の結果は報告されていないが、血中 ANP 濃度に影響する可能性を考慮して、糖尿病 (血糖値  $\geq 280$  mg/dL)または甲状腺機能亢進症 (血清サイロキシン  $>5.0$   $\mu\text{g/dL}$ )の猫は除外した。

### 4) 心エコー図検査

経胸壁心エコー図検査は 7.5–12 MHz のプローブを備えた超音波検査装置を用いて行った。左心房径/大動脈径(LA/Ao)比は過去の報告に示されているスウェーデン法によって測定した[73]。拡張末期心室中隔壁厚、左心室拡張末期径および拡張末期左心室自由壁厚は B モード検査 (n = 28)または M モード検査 (n = 133)から計測した。M モード検査は右傍胸骨短軸断面において実施した。僧帽弁血流速波形を記録するために左傍胸骨長軸断面においてパルスドプラー検査を実施した。僧帽弁尖の先端にサンプルボリュームを設置し、僧帽弁拡張早期血流速度 (E 波)および心房収縮期血流速度を測定した。全ての画像は各施設の 10 人の研究協力者によって解析された。

HCMは拡張末期の心室中隔壁厚または左心室自由壁厚が6.0 mm以上である際に診断した [22]。閉塞性HCMは左心室肥大に加え、Mモード検査において僧帽弁前尖の収縮期前方運動が認められる場合、カラードプラー検査において僧帽弁逆流および左室流出路の動的閉塞が認められる場合、または、連続波ドプラー検査において特徴的な三日月波形を示す左室流出路の血流速度の増加が認められる場合とした [17]。拘束型心筋症は著しい左心房拡大を伴うが、左心室内腔は比較的正常であり左心室壁厚が正常な場合とした [21,22]。未分類心筋症は上記の心筋症の特徴に一致しないにも関わらず、左心房の重度な拡大が認められる場合とした [21,22]。

## 5) 血液生化学検査および ANP 測定

対象猫の血液は初診時に頸静脈から採取した。血液はアプロチニン採血管 (ANP 測定のため)とプレーンチューブ (他の生化学検査のため)に分注し、1,500×g で遠心分離した (4°C、10 分間)。第 1 章の結果より、上清は 1 時間以内に-20°Cで凍結保存し、3 日以内に凍結下で検査センターに送付した (FUJIFILM Monolith)。血糖値、クレアチニン、尿素窒素および血清チロキシン濃度は検査センターで測定した (FUJIFILM Monolith)。血漿 ANP 濃度はヒト用の  $\alpha$ -ANP (C 末端 ANP)測定試薬を用いた自動化化学発光システムによって測定した (CL-JACK NX, Kyowa Medex, 東京, 日本)。全てのアッセイは 2 回繰り返し、平均値を解析に使用した。本アッセイの測定範囲は 5–2,000 pg/mL であった。統計分析のために、ANP アッセイの検出限界以下のデータは 5 pg/mL とした。検査時のバイアスを回避するために、検査技師には猫の病歴および心エコー図検査を含む検査結果を知らせていない。

## 6) 統計分析

データは中央値（四分位範囲）として表記した。データの正規性は Kolmogorov-Smirnov 検定を用いて評価した。2 群間のデータは Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。3 群以上のデータは Kruskal-Wallis 検定を用いて比較した。有意差が認められた場合には、ポストホック分析として Dunn 試験を用いた。心筋症を検出するための血漿 ANP 濃度の診断精度ならびにカットオフ値を求めるために Receiver-operating characteristic (ROC)解析を行った。感度および特異度は統計ソフトを用いて計算した (MedCalc version 12.2.1.0; MedCalc Software, Ostend, ベルギー)。P 値が $<0.05$  の場合に有意差があるとみなした。

### 3. 結果

試験中には 192 頭の猫が参加施設を受診し、検査を受けた。この内、糖尿病の 1 頭、甲状腺機能亢進症の 4 頭、高血圧症の 2 頭を含む 7 頭の猫が除外された。残りの 185 頭の内、心筋症以外の心疾患のため 24 頭を除外した。結果として、対照猫の 78 頭と心筋症猫の 83 頭を含む 161 頭の猫を本研究の供試猫とした。これらの対象猫における受診施設の内訳は酪農学園大学が 50 頭、平成動物病院が 31 頭、宮崎大学が 28 頭、エビス動物病院が 16 頭、オノデラ動物病院が 12 頭、うえだ動物クリニックが 9 頭、かたぎ犬猫病院が 5 頭、上野の森動物病院が 5 頭、ベイ動物病院が 3 頭、日本大学が 2 頭であった。

対照群には 78 頭の猫 (雄 40 頭、雌 38 頭) が含まれ、年齢は 0.5–18.0 歳、体重は 2.1–10.1 kg であった。心筋症群には 83 頭の猫 (雄 53 頭、雌 30 頭) が含まれ、年齢は 0.3–22.0 歳、体重は 1.7–7.0 kg であった。対象猫の血統の中で最も多く認められたのはドメスティック・ショートヘアーであった。本研究に含まれる猫の血統は表 2 に示した。

表 2 供試猫 (161 頭)における血統の内訳

血統	対照群	心筋症群
ドメスティック・ショートヘアー	57	42
スコティッシュフォールド	2	15
アメリカンショートヘア	5	6
メインクーン	0	7
ペルシアン	1	2
ノルウェージャンフォレストキャット	2	4
ラグドール	0	4
ロシアンブルー	3	1
シンガプーラ	3	0
その他	5	2

これらの供試猫の内、34 頭は慢性腎疾患を合併しており、重症度は International Renal Interest Society ステージ $\geq$ II (クレアチニン濃度 $\geq$ 1.6 mg/dL) [35]であった。International Renal Interest Society ステージ II (1.6–2.8 mg/dL)の猫は、対照群の 8 頭、左心房拡大なし群の 5 頭、左心房拡大あり群の 8 頭、心不全群の 10 頭が含まれていた。同様に、ステージ III (2.9–5.0 mg/dL)の猫は、左心房拡大あり群の 2 頭ならびに心不全群の 1 頭が含まれていた。心筋症群には HCM の 38 頭、閉塞性 HCM の 21 頭、拘束型心筋症の 13 頭および未分類型心筋症の 11 頭が含まれていた。心エコー図検査に基づいた心筋症猫の重症度分類を表 3 に示した。心不全群には血栓塞栓症を発症した 7 頭、胸水を伴う 14 頭、心嚢液貯留を伴う 2 頭および肺水腫を発症した 8 頭の猫が含まれていた。

対象猫の身体検査所見、心エコー図検査、血中尿素窒素およびクレアチニン濃度の結果を表 4 に示した。対照群と比較して、拡張末期心室中隔壁は左心房拡大あり群および左心房拡大なし群において有意に肥厚していた。同様に、拡張末期左心室自由壁は左心房拡大あり群および心不全群において有意に肥厚していた。対照群および左心房拡大なし群と比較して、E 波速度は左心房拡大あり群および心不全群において有意に高値であった。血漿尿素窒素濃度は対照群よりも心不全群で有意に高値であったが、クレアチニン濃度に有意差は認められなかった。

表 3. 心筋症猫の心エコー図検査に基づいた重症度分類

	無症候性群		心不全群
	左心房拡大なし	左心房拡大あり	
肥大型心筋症	16	10	12
閉塞性肥大型心筋症	11	9	1
拘束型心筋症	1	4	8
未分類型心筋症	2	3	6

表 4. 各群における身体検査および心エコー図検査の結果

	対照群	無症候性群		心不全群
		左心房拡大なし	左心房拡大あり	
n 数	78	30	26	27
性別 (雄/雌)	40/38	18/12	16/10	19/8
年齢 (y)	7.0 (3.0–11.0)	8.0 (3.0–10.4)	6.0 (3.0–9.0)	11.1 (4.5–13.5)
体重 (kg)	4.2 (3.3–5.0)	4.3 (3.6–5.1)	4.5 (3.6–5.4)	4.2 (3.0–5.2)
心拍数 (bpm)	182 (160–210)	181 (179–204)	189 (166–207)	186 (177–210)
IVSd (mm)	4.3 (3.8–5.0)	6.4 (5.1–7.3)‡	5.6 (4.8–7.2)‡	5.0 (4.0–6.3)
LVIDd (mm)	13.8 (12.6–15.9)	13.3 (11.7–15.5)	15.3 (13.2–17.6)	14.5 (12.7–17.8)
LVPWd (mm)	4.7 (4.0–5.1)	5.3 (4.2–6.2)	6.0 (4.6–6.9)†	5.5 (4.3–8.7)*
LA/Ao 比	1.3 (1.2–1.4)	1.2 (1.1–1.3)	1.9 (1.7–2.4)	2.3 (2.0–2.7)
E 波 (cm/s)	64.0 (54.4–72.6)	68.8 (58.1–87.4)	93.5 (68.4–106.2)‡	91.5 (73.4–124.9)†
尿素窒素 (mg/dL)	26.3 (22.0–29.0)	27.5 (23.0–30.6)	26.0 (21.5–32.5)	34.5 (27.8–39.2)†
クレアチニン (mg/dL)	1.4 (1.1–1.5)	1.3 (1.2–1.4)	1.5 (1.3–1.8)	1.4 (1.0–1.8)

データは中央値 (四分位範囲)として表記した。

E 波; 僧帽弁拡張早期血流速度, IVSd; 拡張末期心室中隔壁厚, LA:Ao 比; 左心房径/大動脈径比, LVIDd; 左心室拡張末期径, LVPWd; 拡張末期左心室自由壁厚

\*  $P < 0.05$  vs 対照群; †  $P < 0.01$  vs 対照群; ‡  $P < 0.001$  vs 対照群.



対照群の血漿 ANP 濃度は左に偏った分布を示していた (低値に偏っていた) (図 6)。血漿 ANP 濃度の中央値は 43.3 (四分位範囲、33.0–56.3) pg/mL であった。雄猫の血漿 ANP 濃度は、雌猫の血漿 ANP 濃度と同等であった。しかし、避妊雌の血中 ANP 濃度は未避妊雌よりも有意に高値であった (図 7)。体重または年齢と血中 ANP 濃度の関係において、体重および年齢が変化しても血中 ANP 濃度に有意な変化はみられなかった (図 7)。

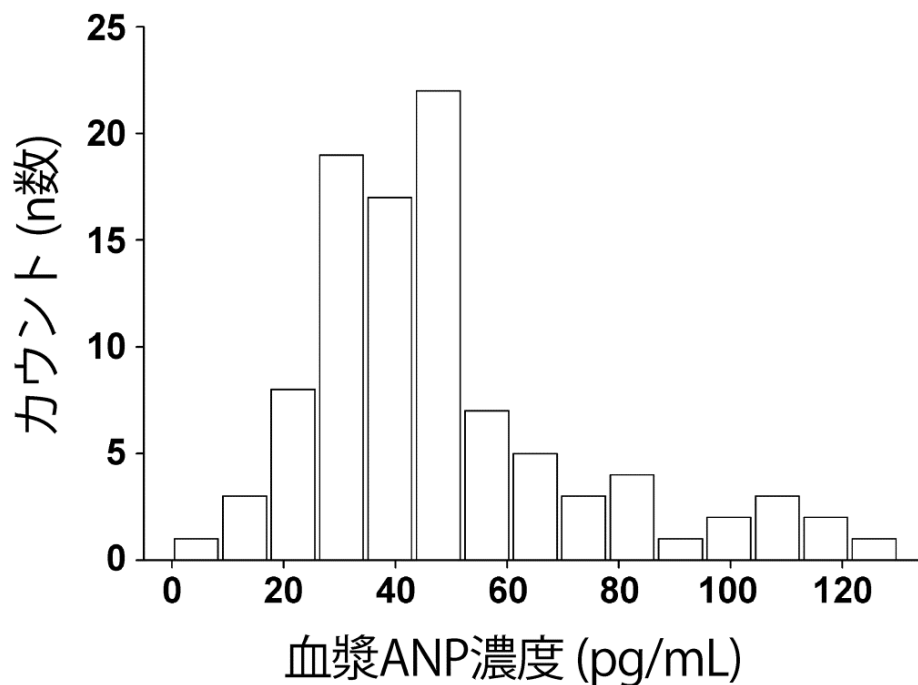


図 6. 対照群 (n = 78)における血漿 ANP 濃度の分布

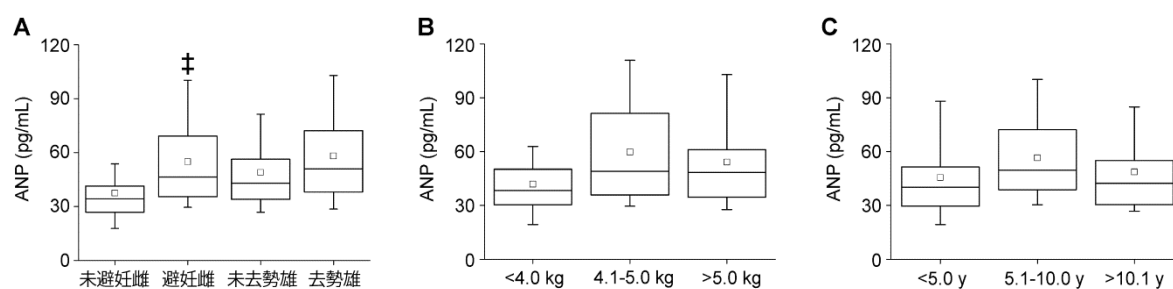


図 7. 対照群における血漿 ANP 濃度の比較

データは中央値 (四分位範囲)として表記した。

A) 血漿 ANP 濃度の性別による比較

未去勢雄 (n = 23)、去勢雄 (n = 17)、未避妊雌 (n = 18)、避妊雌 (n = 20)

‡  $P < 0.001$  vs 未避妊雌

B) 血漿 ANP 濃度の体重による比較

< 4.0 kg (n = 35)、4.1–5.0 kg (n = 23)、> 5.1 kg (n = 20)

C) 血漿 ANP 濃度の年齢による比較

< 5.0 y (n = 30)、5.1–10.0 y (n = 21)、> 10.1 y (n = 27)

対照群および左心房拡大なし群と比較して、血漿 ANP 濃度は左心房拡大あり群および心不全群で有意に増加していた (図 8)。対照群の血漿 ANP 濃度は 43.3 (33.0–56.3) pg/mL であったが、左心房拡大なし群では 65.8 (42.2–92.7) pg/mL, 左心房拡大あり群では 144.7 (58.0–264.6) pg/mL, 心不全群では 197.7 (143.9–471.4) pg/mL であった。

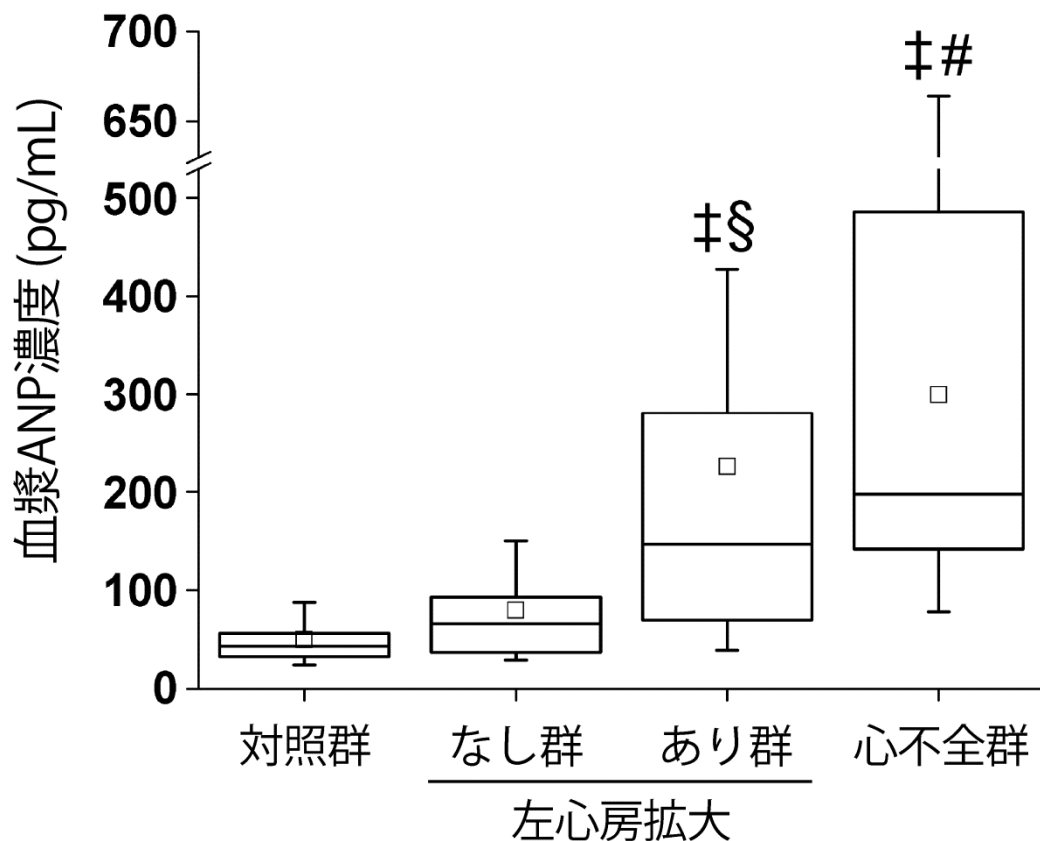


図 8. 対照群と心筋症群の血漿 ANP 濃度の比較

データは中央値 (四分位範囲)として表記した。

‡  $P < 0.001$  vs 対照群; §  $P < 0.05$  vs 左心房拡大なし; #  $P < 0.001$  vs 左心房拡大なし.

心筋症猫の重症度を評価するための ROC 解析の結果を表 5 に示した。全ての心筋症猫 (左心房拡大を伴わない猫を含む)を検出するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は>77.5 pg/mL であり、感度は 66.3% [95%信頼区間: 0.56–0.76]、特異度は 84.6% [0.75–0.91]であった。左心房拡大を有する心筋症猫 (心不全を含む)を左心房拡大のない猫 (対照群ならび左心房拡大なし群を含む)から判別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 110.9 pg/mL であり、中等度の感度 (73.6% [0.60–0.84])と高い特異度 (93.5% [0.87–0.97])が認められた。さらに、全ての猫から心不全猫を区別するためのカットオフ値は 118.6 pg/mL であり、良好な感度 (85.2% [0.68–0.94])と特異度 (85.1% [0.78–0.90])が認められた。ROC 曲線下面積は、それぞれ 0.80 [0.73–0.86], 0.86 [0.80–0.91], 0.87 [0.81–0.92]であった。

表 5. 心筋症猫の重症度を評価するための ROC 解析の結果

	無徴候群		心不全群
	左心房拡大なし	左心房拡大あり	
カットオフ値 (pg/mL)	77.5	110.9	118.6
AUC [95% CI]	0.80 [0.73–0.86]	0.86 [0.80–0.91]	0.87 [0.81–0.92]
感度 (%) [95% CI]	66.3 [0.56–0.76]	73.6 [0.60–0.84]	85.2 [0.68–0.94]
特異度 (%) [95% CI]	84.6 [0.75–0.91]	93.5 [0.87–0.97]	85.1 [0.78–0.90]

AUC; ROC 解析曲線下面積, CI; 信頼区間

拘束型心筋症および未分類型心筋症の猫を解析対象から除外した場合、心筋症猫 (左心房拡大を伴わない猫を含む)を検出するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は >58.5 pg/mL であり、感度は 71.2% [95%信頼区間: 0.59–0.81]、特異度は 76.9% [0.66–0.85]であった。左心房拡大を有する心筋症猫 (心不全を含む)と左心房拡大のない猫 (対照群ならび左心房拡大なし群を含む)を判別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 110.9 pg/mL であり、中等度の感度 (71.9% [0.88–0.97])と高い特異度 (94.3% [0.87–0.97])が認められた。さらに、全ての猫から心不全猫を判別するためのカットオフ値は 118.6 pg/mL であり、高い感度 (84.6% [0.58–0.96])と高い特異度 (87.9% [0.81–0.93])が認められた。ROC 曲線下面積は、それぞれ 0.78 [0.70–0.86]、0.87 [0.79–0.84]、および 0.87 [0.77–0.97]であった。

#### 4. 考察

ネコの心疾患において、HCM は最も遭遇頻度の高い疾患であり、57.5%を占めることが報告されている [21, 23]。本研究では、10 施設から心エコー図検査に基づいた心筋症猫を収集し、83 頭の心筋症猫の中で 59 頭 (71.1%)は HCM が占めていた。過去の報告に比べて我々の研究で HCM 猫の割合が高かった理由として、研究対象の母集団が異なっている事や、心エコー図検査の精度が向上したことで従来は見逃されていた閉塞性 HCM を診断できるようになったことが挙げられる。これらの猫は ANP の測定結果や他の検査結果に基づいて選別しておらず、症例選別時のバイアスによる偏りとは考えにくい。

本研究では外部検査機関を利用して血漿 ANP 濃度を測定し、78 頭の対照猫における血漿 ANP 濃度の中央値は 43.3 (33.0–56.3) pg/mL であった。一方、過去の研究では、健康猫の血漿 ANP 濃度の平均値は 18.5 pg/mL であったと報告されている [33]。我々の結果が以前の結果よりも高値であった理由として、以前の研究では 5 匹の健康な猫を対象としており、母集団の小さかったことが挙げられる。さらに、以前の報告ではラジオイムノアッセイを用いており、本研究では化学発光酵素免疫測定法によって ANP を測定していることから、研究間における ANP 測定方法の違いが結果に影響を与えた可能性がある。

本研究では、対照猫における年齢および体重は血漿 ANP 濃度に影響しなかった。同様に、MacLean らは、HCM 猫の血中 NT-proANP 濃度は年齢または体重と関連しなかったことを報告している [42]。また、本研究では血漿 ANP 濃度に雌雄間の性差は認められなかったが、避妊雌の血漿 ANP 濃度は未避妊雌よりも高値であった。健康犬を対象にした以前の研究では、雄の血中 NT-proANP と NT-proBNP 濃度は雌よりも

有意に高値であることが示されている [63]。一方で、性別はイヌの NT-proANP ならびに NT-proBNP 濃度に影響しないという報告もみられ [11]、性別が血漿 ANP 濃度に及ぼす影響については統一見解が得られていない。これは研究間の母集団の違いを反映している可能性がある。本研究は性別に加えて血統や年齢に大きな偏りが生じているため、ネコの血漿 ANP 濃度に対する性別の影響を調べるためには更なる研究が必要である。

血漿 ANP および NT-proANP 濃度は心筋症猫において有意に増加していることが報告されている [33, 72, 73]。Zimmering らは、心筋症の種類を問わず左心房拡大のみられる症例では血中 NT-proANP 濃度が上昇しており、うっ血性心不全を発症している心筋症猫では血中 NT-proANP 濃度が顕著に上昇することを報告している [72, 73]。しかし、これらの研究における心筋症猫の母集団は 32 匹または 51 匹と比較的小さく、左心房拡大を伴う猫と正常左心房サイズの猫は区別されていない。一方、我々の研究は過去の研究に比べてより多くの症例を対象とすることで、血漿 ANP 濃度の臨床的意義を詳細に解析している。今回の研究では、左心房拡大を伴わない無症候性心筋症猫の血漿 ANP 濃度は対照猫と同等であったが、左心房拡大を伴う無症候性心筋症猫の血漿 ANP 濃度は有意に上昇していることが明らかとなった。この結果の最も可能性の高い説明として、左心房の拡大は ANP 分泌を促す主要な要因であることが挙げられる [20, 71]。実際に、容量負荷をかけた猫においては血漿 ANP 濃度が即座に上昇し、血漿 ANP 濃度は猫の左心房圧と強く相関していることが報告されている [33]。これは心筋症が左心房の血液うっ滞を引き起こし、その結果として生じる左心房壁の伸展が ANP 分泌を誘発するという現象を反映している。

NT-proANP および NT-proBNP アッセイは心筋症猫の診断に有用であり、高い診断

精度を示すことが報告されている [19, 24, 66, 72]。しかし、心筋症猫の重症度評価を目的とした ANP アッセイの診断精度に関する報告はない。本研究では、全ての心筋症猫と対照猫を鑑別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 77.5 pg/mL であり、この時の感度は 66.3%と低かったが特異度は 84.6%と比較的良好な結果を示した。また、心筋症と診断した 83 頭の中で 28 頭が 77.5 pg/mL 以下であったことから、血漿 ANP 濃度の測定は左心房拡大を示さない無症候性心筋症猫のスクリーニングには有用性が低い可能性がある。対照的に、Zimmering らの報告では、心筋症の有無を診断するための血中 NT-proANP 濃度の診断基準値は 517 fmol/mL であり、高い感度 (82%)と特異度 (90%)を示し、ROC 曲線下面積は 0.93 であった [72]。彼らの研究では無症候性猫が含まれていたものの、左心房拡大を伴う猫と正常な左心房サイズの猫は区別されていない。また、NT-proANP の半減期は ANP の半減期よりも長いことが報告されており [61, 65]、これらの違いが ROC 解析の結果に影響している可能性がある。

我々の研究では、左心房拡大を有する心筋症猫を同定するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は、心不全猫を同定するためのカットオフ値と同等であった。左心房拡大を診断するためのカットオフ値は 110.9 pg/mL であり、中等度の感度 (73.6%)と高い特異度 (93.5%)を示した。さらに、心不全を診断するためのカットオフ値は 118.6 pg/mL であり、良好な感度 (85.2%)および特異度 (85.1%)を示した。これらの結果は血漿 ANP 濃度が 110.9 pg/mL 以上の場合には、心筋症によって左心房拡大が引き起こされている可能性を示している。さらに、この知見は心筋症を疑う猫において心エコー図検査の必要性を判断するために、他の臨床データと併せて ANP アッセイを用いることの重要性を示している。

ANP に加えて、血中 NT-proBNP 濃度は正常猫よりも無症候性心筋症の猫で有意に



高値を示すことが報告されている [19, 25, 66]。さらに、Fox らは ROC 解析に基づいて NT-proBNP アッセイの診断精度を報告しており、無症候性心筋症を検出するための血漿 NT-proBNP 濃度のカットオフ値は  $>46$  pmol/L であり、この時の感度は 85.8%、特異度は 91.2%、ROC 曲線下面積は 0.92 であった [25]。彼らの研究では様々な心筋症を含んでおり、左心房拡大の有無を区別した診断精度は明らかになっていない。一方、我々の研究では、HCM 猫に限定した場合に全ての HCM 猫を検出するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は  $>58.5$  pg/mL であり、感度は 71.2%、特異度は 76.9%、ROC 曲線下面積は 0.78 であった。さらに、左心房拡大を有する HCM 猫を判別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 110.9 pg/mL であり、感度は 71.9%、特異度は 94.3%、ROC 曲線下面積は 0.87 であった。NT-proBNP は主に心室筋から産生・分泌されるため [61]、血中 NT-proBNP 濃度はネコの心室筋障害を密接に反映する可能性が推察される。これらの研究は母集団が異なっているため、結果を直接比較することは出来ないが、無症候性心筋症猫の診断精度は ANP よりも NT-proBNP の方が高い可能性がある。従って、心筋症の猫における ANP と NT-proBNP の診断精度を比較するための更なる研究が求められる。

本研究には以下のような幾つかの制約が挙げられる。今回の研究では、左心室壁の厚さを計測する際に異なる検査法 (M-モード検査と B-モード検査) が用いられているため、このことが検査結果に影響を与えた可能性がある。加えて、本研究には様々なタイプの心筋症が含まれていたため、個々の心筋症では診断基準値が異なっている可能性を否定できない。また、本研究には腎疾患を併発している 34 頭の猫が含まれていた。慢性腎疾患の猫においては、血漿中のクレアチニン濃度と NT-proANP 濃度が有意に相関することが報告されており、正常猫と比較して重症例では両者の血中濃度

が高いことが明らかになっている [40]。従って、腎機能が猫の血漿 ANP 濃度に影響を与える可能性に注意するべきである。さらに、循環器薬は血漿 ANP 濃度に影響を与える可能性があるが、我々は心筋症猫に処方されていた循環器薬を記録していない。最後に、甲状腺機能亢進症、頻脈、および炎症性疾患は血漿 ANP または NT-proBNP 濃度の上昇と関連する可能性がある [46, 69, 70]。これらの疾患を併発している心筋症猫では診断基準が変わる可能性がある。

我々の研究から、ネコ血漿 ANP 濃度は心筋症の重症度を反映して上昇していることが明らかとなった。また、全ての心筋症猫と対照猫を鑑別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 77.5 pg/mL であり、感度は 66.3%と低かったが特異度は 84.6%と比較的良好な結果を示した。一方、左心房拡大を有する心筋症猫を同定するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は、心不全猫を同定するためのカットオフ値と同等であり、良好な感度および特異度を示した。これらの結果は血漿 ANP 濃度が 110.9 pg/mL 以上の場合には心筋症を疑い、心エコー図検査を実施する必要性を示している。

## 5. 小括

心筋症の猫では血漿 ANP 濃度が上昇することが報告されているが、心筋症の重症度を評価・予測するための血漿 ANP 濃度の基準値は知られていない。第3章では、血漿 ANP 濃度を用いた心筋症猫における重症度評価の診断精度を精査した。本研究では、78頭の非心疾患猫 (対照猫) および 83頭の様々な心筋症を有する猫を対象とした。対照猫は心エコー図検査を用いて心疾患に罹患していないことを確認した。心筋症猫は心エコー図検査を用いて診断し、左心房拡大を伴わない無症候群; 左心房拡大なし、左心房拡大を伴う無症候群; 左心房拡大あり、および心不全群に分けた。血漿 ANP 濃度は外部検査センターで、化学発光酵素免疫測定法によって測定した。対照群における血漿 ANP 濃度の中央値は 43.3 (四分位範囲、33.0-56.3) pg/mL であった。左心房拡大あり群および心不全群の血漿 ANP 濃度は有意に高値を示したが、左心房拡大なし群の血漿 ANP 濃度は対照群と同等であった。心筋症猫を対照猫と区別するための血漿 ANP 濃度のカットオフは 77.5 pg/mL であり、感度は 66.3%、特異度は 84.6% であった。左心房拡大を有する心筋症猫を同定するための血漿 ANP 濃度のカットオフは 110.9 pg/mL であり、感度は 73.6%、特異度は 93.5% であった。AUC はそれぞれ 0.80 および 0.86 であった。血漿 ANP 濃度は心筋症の重症度に比例して増加していた。ANP 濃度の測定のみでは特定の心疾患を診断することは出来ないが、血漿 ANP 濃度は心筋症の重症度評価に有用な付加的情報を提供できることが示唆された。

## 総括

心臓バイオマーカーとは心臓で産生され、血中に分泌・放出される蛋白質やホルモンを指し、獣医療では ANP、NT-proBNP、心筋トロポニンが臨床応用されている。この中で、ANP は 28 アミノ酸からなり、主に心房筋の分泌顆粒にプレホルモンとして恒常的に貯蔵されている。心房筋が伸展するとプレホルモンがプロセッシングを受けて、生理活性を持つ ANP と生理活性を持たない NT-proANP が即座に血中に放出される [3, 43, 50, 61, 62]。過去の報告では、血中 ANP 濃度は左心房への負荷を強く反映する心臓バイオマーカーであることが示されている [31]。例えば、僧帽弁閉鎖不全症犬の血中 ANP 濃度は左心房サイズと有意に相関することが報告されている [2, 34]。また、イヌ・ネコを対象にした臨床研究においては、血中 ANP 濃度の測定は慢性心不全の診断や重症度評価に有用であることが明らかとなっている [2, 34, 54, 68]。ネコでは HCM ならびに拘束型心筋症の発症が多く [55, 59]、これらの心筋症は心エコー図検査を用いて検査・診断されている。しかし、心エコー図検査には高額な機器が必要であり、高度な技術を要するため、ネコにおける心筋症の早期診断は依然として困難であり、心不全を発症してから診断されるケースも少なくない。従って、安価で簡便に心筋症を検出できる検査法の確立が求められるが、ネコにおける ANP アッセイ系の基礎的有用性は不明であり、さらに、心筋症が大多数を占めるネコにおける ANP の臨床的意義は十分に解明されていない。

本研究では、ネコにおける ANP アッセイ系の確立と心筋症猫の早期診断および重症度評価を目的とした診断精度の解明を最終目標とし、第 1 章では、ヒト ANP アッセイ系がネコ ANP の測定に応用可能かどうかを精査するために、*in vitro* 試験を通して ANP アッセイ系の基礎的解析を行った。また、サンプルの取扱法 (採血方法や保

存方法など)と ANP の測定結果の関係について精査した。第 2 章では、血中 ANP 濃度に対する血行動態の影響を精査するために、全身麻酔下の健康猫の血圧と血中 ANP 濃度の関係を解析した。第 3 章では、心筋症猫において血中 ANP 濃度を測定し、ANP を用いた心筋症の診断ならびに重症度評価の診断精度を解析した。

第 1 章ではネコ血漿を用いて ANP の希釈試験を実施すると共に、血漿 ANP 濃度の保存安定性を評価した。希釈試験では心不全猫の静脈血からアプロチニン血漿を採取し、生理食塩水を用いて 2 倍階段希釈した。血漿 ANP 濃度はヒト  $\alpha$ -ANP キットを用いて、化学発光酵素免疫測定法によって測定した。心不全猫の血漿 ANP 濃度は階段希釈によって段階的に減少し、ヒト ANP 標準試薬との間でパラレルリズムが確認された。次に、ANP の試験管内安定性を評価するために、健康猫の静脈血からアプロチニン血漿および血清を採取し、室温 (27°C) で保存したサンプルにおける ANP 濃度の経時的変化を評価した。血清 ANP 濃度は経時的に有意な低下を示し、12 時間後にはベースライン値から約 80% も低下した。一方、血漿 ANP 濃度の減少率は 12 時間後まで 6% 前後であり、血漿 ANP 濃度の減少率は血清サンプルと比較し有意に抑制されていた。最後に、サンプルの保存温度と ANP 測定値の関係を評価するために、健康猫のアプロチニン血漿を異なる温度 (4°C, -20°C, -70°C) で 14 日間保持した。-70°C で保存した血漿 ANP 濃度は、14 日後もベースライン (0 日目) と同等であった。-20°C で保存した血漿 ANP 濃度は、7 日後までベースラインと同等であったが、14 日後にはベースライン値の 87.0% に低下した。一方、4°C で保存した血漿 ANP 濃度は 1 日後にはベースライン値の 93.3% に減少し、7 日後に 57.6%、14 日後に 18.0% と、継日的に減少した。以上のことから、ネコ ANP を測定する際には採血時の血液サンプルにアプロチニンの添加が必要であり、ネコの血漿サンプルは -20°C 以下で直ちに保存し、7 日以内

に測定する必要性が明らかになった。

第 2 章では健康猫を用いて全身麻酔を行い、麻酔前後での血漿 ANP 濃度と全身血圧の関係を精査した。健康な猫に全身麻酔を実施し、鎮静前と全身麻酔の 30 分後に血漿 ANP 濃度を測定した。麻酔前に比べて、全身麻酔後には心拍数、収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧が有意に低下した。同様に、麻酔前に比べて、全身麻酔後は急速かつ有意に血漿 ANP 濃度が減少した。また、血漿 ANP 濃度は収縮期血圧 ( $r = 0.59$ ) ならびに平均血圧 ( $r = 0.56$ ) と有意に相関していたが、心拍数 ( $r = 0.50$ ) および拡張期血圧 ( $r = 0.49$ ) との相関性は認められなかった。この研究から、ネコ血漿 ANP 濃度は動脈圧の影響を受けている可能性が明らかになり、ネコの興奮状態は血中 ANP 濃度に影響することが推察される。

第 3 章では、健康猫 (78 頭) と心筋症猫 (83 頭) の血中 ANP 濃度を重症度毎に比較すると共に、心筋症の異なる重症度を特定するための血漿 ANP 濃度の診断精度を精査した。心筋症猫は左心房拡大を伴わない無症候群; 左心房拡大なし、左心房拡大を伴う無症候群; 左心房拡大あり、心不全群の猫 3 群に分けた。対照群の血漿 ANP 濃度の中央値は 43.3 (四分位範囲、33.0–56.3) pg/mL であった。対照群および左心房拡大なし群と比較して、血漿 ANP 濃度は左心房拡大あり群および心不全群で有意に増加していた。ROC 解析では、心筋症猫を検出するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は  $>77.5$  pg/mL であり、感度は 66.3%、特異度は 84.6% であった。左心房拡大を有する心筋症猫を識別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 110.9 pg/mL であり、中等度の感度 (73.6%) と高い特異度 (93.5%) が認められた。さらに、心不全猫を区別するためのカットオフ値は 118.6 pg/mL であり、良好な感度 (85.2%) と特異度 (85.1%) が認められた。ROC 曲線下面積は、それぞれ 0.80, 0.86, 0.87 であった。この研究から、ネコ

血漿 ANP 濃度は心筋症の重症度を反映して上昇しており、血漿 ANP 濃度が 110.9 pg/mL 以上の場合には心筋症による左心房拡大が生じている可能性の高いことが示唆される。

以上のことから、マウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体がネコ ANP に対して親和性を有し、ネコの循環器検査法として臨床応用が可能であることが明らかとなった。また、ネコ ANP を測定する際には採血時の血液サンプルにアプロチニンの添加が必要であり、ネコの血漿サンプルは-20℃以下で直ちに保存し、7 日以内に測定する必要がある。血漿 ANP 濃度に影響する生理学的要因の一つとして全身血圧に留意する必要がある。正確な ANP 測定値を得るためには鎮静剤や麻酔薬を使用せずに安静時の採血を実施すべきである。最後に、血漿 ANP 濃度は心筋症の重症度に比例して増加しており、心筋症猫を検出するための血漿 ANP 濃度のカットオフは 77.5 pg/mL、左心房拡大を有する心筋症猫を同定するための血漿 ANP 濃度のカットオフは 110.9 pg/mL であった。血中 ANP 濃度の測定のみでは特定の心疾患を診断することは出来ないが、血漿 ANP 濃度は心筋症の重症度評価に有用な付加的情報を提供できることが示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始ご指導およびご校閲を賜りました酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 伴侶動物医療学分野 伴侶動物内科学 II ユニット 堀 泰智准教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文の作成において、終始適切なご指導ならびにご助言を賜りました酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 伴侶動物医療学分野 画像診断学ユニット中出哲也教授ならびに獣医麻酔学ユニット 山下和人教授に深く感謝いたします。

臨床例の収集において多大なるご協力を頂きました、宮崎大学 中村健介先生、エビス動物病院 山下洋平先生、上野の森どうぶつ病院 諫山紀子先生、日本大学 生物資源学部 獣医内科学研究室 菅野信之先生、かたぎ犬猫病院 堅木道夫先生、オノデラ動物病院 小野寺 秀之先生、うえだ動物クリニック 山野茂樹先生、ベイ動物病院 荒蒔義隆先生に感謝いたします。最後に、実験動物の管理および実験の遂行にあたり快くご協力をいただきました北里大学 小動物内科の学生各位に心より深謝いたします。



## 引用文献

1. Akkerdaas, L. C., Mioch, P., Sap, R. and Hellebrekers, L. J. 2001. Cardiopulmonary effects of three different anaesthesia protocols in cats. *Vet. Q.* 4: 182-186.
2. Asano, K., Masuda, K., Okumura, M., Kadosawa, T. and Fujinaga, T. 1999. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 523-529.
3. Asano, K., Murakami, M., Endo, D., Kimura, T. and Fujinaga, T. 1999. Complementary DNA cloning, tissue distribution, and synthesis of canine brain natriuretic peptide. *Am. J. Vet. Res.* 60: 860-864.
4. Atkins, C. E., Gallo, A. M., Kurzman, I. D. and Cowen, P. 1992. Risk factors, clinical signs, and survival in cats with a clinical diagnosis of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: 74 cases (1985-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201: 613-618.
5. Baldo, C. F., Garcia-Pereira, F. L., Nelson, N. C., Hauptman, J. G. and Shih, A. C. 2012. Effects of anesthetic drugs on canine splenic volume determined via computed tomography. *Am. J. Vet. Res.* 73: 1715-1719.
6. Belew, A. M., Barlett, T. and Brown, S. A. 1999. Evaluation of the white-coat effect in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 13: 134-142.
7. Bentley, G. N., Gent, J. P. and Goodchild, C. S. 1989. Vascular effects of propofol: smooth muscle relaxation in isolated veins and arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 797-798.
8. Biondo, A. W., Ehrhart, E. J., Sisson, D. D., Bulmer, B. J., De Morais, H. S. and Solter, P. F. 2003. Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Vet. Pathol.* 40: 501-506.
9. Biondo, A. W., Liu, Z. L., Wiedmeyer, C. E., De Morais, H. S., Sisson, D. D. and Solter, P.

- E. 2002. Genomic sequence and cardiac expression of atrial natriuretic peptide in cats. *Am. J. Vet. Res.* 63: 236-240.
10. Borgeson, D. D., Stevens, T. L., Heublein, D. M., Matsuda, Y. and Burnett, J. C. 1998. Activation of myocardial and renal natriuretic peptides during acute intravascular volume overload in dogs: functional cardiorenal responses to receptor antagonism. *Clin. Sci.* 95: 195-202.
11. Boswood, A., Dukes-McEwan, J., Loureiro, J., James, R. A., Martin, M., Stafford-Johnson, M., Smith, P., Little, C. and Attree, S. 2008. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J. Small. Anim. Pract.* 49: 26-32.
12. Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., Egner, B., Elliott, J., Henik, R., Labato, M., Littman, M., Polzin, D., Ross, L., Snyder, P. and Stepien, R. 2007. American College of Veterinary Internal Medicine. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 21: 542-558.
13. Buckley, M. G., Marcus, N. J. and Yacoub, M. H. 1999. Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: importance for assessing cardiac function in clinical practice. *Clin. Sci.* 97: 689-695.
14. Bustamante, R., Aguado, D., Cediell, R., Gómez de Segura, I. A. and Canfrán, S. 2018. Clinical comparison of the effects of isoflurane or propofol anaesthesia on mean arterial blood pressure and ventilation in dogs undergoing orthopaedic surgery receiving epidural anaesthesia. *Vet. J.* 233: 49-54.
15. Chen, H. H., Schirger, J. A., Chau, W. L., Jougasaki, M., Lisy, O., Redfield, M. M., Barclay, P. T. and Burnett, J. C. Jr. 1999. Renal response to acute neutral endopeptidase

- inhibition in mild and severe experimental heart failure. *Circulation* 100: 2443-2448.
16. Collins, S. A., Patteson, M. W., Connolly, D. J., Brodbelt, D. C., Torrance, A. G. and Harris, J. D. 2010. Effects of sample handling on serum N-terminal proB-type natriuretic peptide concentration in normal dogs and dogs with heart disease. *J. Vet. Cardiol.* 12: 41-48.
  17. Connolly, D. J., Cannata, J., Boswood, A., Archer, J., Groves, E. A. and Neiger, R. 2003. Cardiac troponin I in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Feline Med. Surg.* 5: 209-216.
  18. Connolly, D. J., Hezzell, M. J., Fuentes, V. L., Chang, Y. M., Swan, R. and Syme, H. M. 2011. The effect of protease inhibition on the temporal stability of NT-proBNP in feline plasma at room temperature. *J. Vet. Cardiol.* 13: 13-19.
  19. Connolly, D. J., Magalhaes, R. J., Syme, H. M., Boswood, A., Fuentes, V. L., Chu, L. and Metcalf, M. 2008. Circulating natriuretic peptides in cats with heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 96-105.
  20. Dzimiri, N., Moorji, A., Afrane, B. and Al-Halees, Z. 2002. Differential regulation of atrial and brain natriuretic peptides and its implications for the management of left ventricular volume overload. *Eur. J. Clin. Invest.* 32: 563-569.
  21. Ferasin, L. 2009. Feline myocardial disease. 1: Classification, pathophysiology and clinical presentation. *J. Feline Med. Surg.* 11: 3-13.
  22. Ferasin, L. 2009. Feline myocardial disease 2: diagnosis, prognosis and clinical management. *J. Feline Med. Surg.* 11: 183-194.
  23. Ferasin, L., Sturgess, C. P., Cannon, M. J., Caney, S. M., Gruffydd-Jones, T. J. and Wotton, P. R. 2003. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *J. Feline Med. Surg.* 5: 151-159.

24. Fox, S. M. 1999. Textbook of canine and feline cardiology, 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company. pp.621-645.
25. Fox, P. R., Rush, J. E., Reynolds, C. A., DeFrancesco, T. C., Keene, B. W., Atkins, C. E., Gordon, S. G., Schober, K. E., Bonagura, J. D., Stepien, R. L., Kellihan, H. B., Macdonald, K. A., Lehmkuhl, L. B., Nguyenba, T. P., Sydney-Moise, N., Lefbom, B. K., Hogan, D. F. and Oyama, M. A. 2011. Multicenter evaluation of plasma N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-pro BNP) as a biochemical screening test for asymptomatic (occult) cardiomyopathy in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 25: 1010-1016.
26. Gobinet-Georges, A., Valli, N., Filliatre, H., Dubernet, M. F., Dedeystere, O. and Bordenave, L. 2000. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human whole blood and plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38: 519-523.
27. Greco, D. S., Biller, B. and Van Liew, C. H. 2003. Measurement of plasma atrial natriuretic peptide as an indicator of prognosis in dogs with cardiac disease. *Can. Vet. J.* 44: 293-297.
28. Häggström, J., Hansson, K., Karlberg, B. E., Kwart, 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.
29. Heishima, Y., Hori, Y., Chikazawa, S., Kanai, K., Hoshi, F. and Itoh, N. 2016. Indirect arterial blood pressure measurement in healthy anesthetized cats using a device that combines oscillometry with photoplethysmography. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 1179-1182.
30. Hoka, S., Yamaura, K., Takenaka, T. and Takahashi, S. 1998. Propofol-induced increase in vascular capacitance is due to inhibition of sympathetic vasoconstrictive activity. *Anesthesiology* 89: 1495-1500.
31. Hori, Y., Sano, N., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N. and Higuchi, S. 2010. Acute cardiac volume load-related changes in plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in healthy dogs. *Vet. J.* 185: 317-321.

32. Hori, Y., Ukai, Y., Uechi, M., Hoshi, F. and Higuchi, S. 2008. Relationships between velocities of pulmonary venous flow and plasma concentrations of atrial natriuretic peptide in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 69: 465-470.
33. Hori, Y., Yamano, S., Iwanaga, K., Kano, T., Tanabe, M., Uechi, M., Kanai, K., Nakao, R., Hoshi, F. and Higuchi, S. 2008. Evaluation of plasma C-terminal atrial natriuretic Peptide in healthy cats and cats with heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 135-139.
34. Hori, Y., Yamano, S., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N., and Higuchi, S. 2011. Clinical implications of measurement of plasma atrial natriuretic peptide concentration in dogs with spontaneous heart disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239: 1077-1083.
35. International Renal Interest Society. IRIS Staging of CKD (modified 2016) - IRIS Kidney. [http://iris-kidney.com/pdf/3\\_staging-of-ckd.pdf](http://iris-kidney.com/pdf/3_staging-of-ckd.pdf) (2016, accessed June 10, 2017).
36. Iwata, H. and Hirai, M. 2005. Photoplethysmography. *J. Jpn. Coll. Angiol.* 45: 329-332.
37. Jardine, A. G., Connell, J. M., Northridge, D., Dilly, S. G., Cussans, N. J., Davidson, G., Doyle, J., Leckie, B. L. and Lever, A. F. 1990. The atriopeptidase inhibitor UK 69,578 increases atrial natriuretic factor and causes a natriuresis in normal humans. *Am. J. Hypertens.* 3: 661-667.
38. Kittleson, M. D., Meurs, K. M., Munro, M. J., Kittleson, J. A., Liu, S. K., Pion, P. D. and Towbin, J. A. 1999. Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation* 99: 3172-3180.
39. Koukoulis, G., Polymeris, A., Tzavara, I., Pappas, D. and Thalassinos, N. 2002. Normalization of thyroid hormone levels in patients with either hyper- or hypothyroidism results in a profound change of atrial natriuretic peptide (ANP) levels. *Hormones (Athens)*. 1: 104-112.
40. Lalor, S. M., Connolly, D. J., Elliott, J. and Syme, H. M. 2009. Plasma concentrations of

- natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Cardiol.* 1: S71-79.
41. Levin, E. R., Gardner, D. G. and Samson, W. K. 1998. Natriuretic peptides. *N. Engl. J. Med.* 339: 321-328.
  42. MacLean, H. N., Abbott, J. A., Ward, D. L., Huckle, W. R., Sisson, D. D. and Pyle, R. L. 2006. N-terminal atrial natriuretic peptide immunoreactivity in plasma of cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 284-289.
  43. Maeda, K., Tsutamoto, T., Wada, A., Mabuchi, N., Hayashi, M., Hisanaga, T., Kamijo, T. and Kinoshita, M. 2000. Insufficient secretion of atrial natriuretic peptide at acute phase of myocardial infarction. *J. Appl. Physiol.* 89: 458-464.
  44. Magnusson, M., Jujic, A., Hedblad, B., Engström, G., Persson, M., Struck, J., Morgenthaler, N. G., Nilsson, P., Newton-Cheh, C., Wang, T. J. and Melander, O. 2012. Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 638-645.
  45. Matsumoto, N., Akaike, M., Nishiuchi, T., Kawai, H. and Saito, S. 1997. Different secretion profiles of atrial and brain natriuretic peptides after acute volume loading in patients with ischemic heart disease. *Acta. Cardiol.* 52: 261-272.
  46. Menaut, P., Connolly, D. J., Volk, A., Pace, C., Luis Fuentes, V., Elliott, J. and Syme, H. 2012. Circulating natriuretic peptide concentrations in hyperthyroid cats. *J. Small Anim. Pract.* 53: 673-678.
  47. Merin, R. G., Bernard, J. M., Doursout, M. F., Cohen, M. and Chelly, J. E. 1991. Comparison of the effects of isoflurane and desflurane on cardiovascular dynamics and regional blood-flow in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology* 74: 568-574.
  48. Meurs, K. M., Norgard, M. M., Kuan, M., Haggstrom, J. and Kittleson, M. 2009.

- Analysis of 8 sarcomeric candidate genes for feline hypertrophic cardiomyopathy mutations in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 23: 840-843.
49. Miyagawa, Y., Tominaga, Y., Toda, N. and Takemura, N. 2013. Relationship between glomerular filtration rate and plasma N-terminal pro B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with chronic kidney disease. *Vet. J.* 197: 445-450.
  50. Moe, G. W., Grima, E. A., Wong, N. L., Howard, R. J. and Armstrong, P. W. 1996. Plasma and cardiac tissue atrial and brain natriuretic peptides in experimental heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27: 720-727.
  51. Mueller, T., Gegenhuber, A., Dieplinger, B., Poelz, W. and Haltmayer, M. 2004. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42: 942-944.
  52. Mutoh, T., Nishimura, R., Kim, H. Y., Matsunaga, S. and Sasaki, N. 1997. Cardiopulmonary effects of sevoflurane, compared with halothane, enflurane, and isoflurane, in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 58: 885-890.
  53. O'Sullivan, M. L., O'Grady, M. R. and Minors, S. L. 2007. Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 21: 92-99.
  54. Oyama, M. A., Fox, P. R., Rush, J. E., Rozanski, E. A. and Lesser, M. 2008. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232: 1496-1503.
  55. Paige, C. F., Abbott, J. A., Elvinger, F. and Pyle, R. L. 2009. Prevalence of cardiomyopathy in apparently healthy cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234: 1398-1403.

56. Poterack, K. A., Kampine, J. P. and Schmeling, W. T. 1991. Effects of isoflurane, midazolam, and etomidate on cardiovascular responses to stimulation of central nervous system pressor sites in chronically instrumented cats. *Anesth. Analg.* 73: 64-75.
57. Prosek, R., Sisson, D. D., Oyama, M. A. and Solter, P. F. 2007. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J. Vet. Intern. Med.* 21: 238-242.
58. Qi, W., Kjekshus, J. and Hall, C. 2000. Differential responses of plasma atrial and brain natriuretic peptides to acute alteration in atrial pressure in pigs. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 60: 55-63.
59. Riesen, S. C., Kovacevic, A., Lombard, C. W. and Amberger, C. 2007. Echocardiographic screening of purebred cats: an overview from 2002 to 2005. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 149: 73-76.
60. Rush, J. E., Freeman, L. M., Fenollosa, N. K. and Brown, D. J. 2002. Population and survival characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990-1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220: 202-207.
61. Ruskoaho, H. 2003. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr. Rev.* 24: 341-356.
62. Seilhamer, J. J., Arfsten, A., Miller, J. A., Lundquist, P., Scarborough, R. M., Lewicki, J. A. and Porter, J. G. 1989. Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 650-658.
63. Sjöstrand, K., Wess, G., Ljungvall, I., Häggström, J., Merveille, A. C., Wiberg, M., Gouni, V., Lundgren Willesen, J., Hanås, S., Lequarré, A. S., Mejer Sørensen, L., Wolf, J., Tiret, L., Kierczak, M., Forsberg, S., McEntee, K., Battaille, G., Seppälä, E., Lindblad-Toh, K., Georges, M., Lohi, H., Chetboul, V., Fredholm, M. and Höglund, K. 2014. Breed



- differences in natriuretic peptides in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 28: 451-457.
64. Smith, S. A., Tobias, A. H., Jacob, K. A., Fine, D. M. and Grumbles, P. L. 2003. Arterial thromboembolism in cats: acute crisis in 127 cases (1992-2001) and long-term management with low-dose aspirin in 24 cases. *J. Vet. Intern. Med.* 17: 73-83.
65. Takemura, N., Koyama, H., Sako, T., Ando, K., Suzuki, K., Motoyoshi, S. and Marumo, F. 1990. Pharmacokinetics of human alpha-atrial natriuretic peptide (alpha-hANP) in cow and dog. *Nippon Juigaku Zasshi* 52: 165-166.
66. Tominaga, Y., Miyagawa, Y., Toda, N. and Takemura, N. 2011. The diagnostic significance of the plasma N-terminal pro-B-type natriuretic Peptide concentration in asymptomatic cats with cardiac enlargement. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 971-975.
67. Trapani, A. J., Beil, M. E., Bruseo, C. W., Fink, C. A., Hoyer, D., Savage, P. and Jeng, A. Y. 2002. Effects of the ECE/NEP inhibitor CGS 34225 on the big ET-1-induced pressor response and plasma atrial natriuretic peptide concentration in conscious rats. *Clin. Sci.* 103: 102S-106S.
68. Tsutamoto, T., Wada, A., Maeda, K., Hisanaga, T., Maeda, Y., Fukai, D., Ohnishi, M., Sugimoto, Y. and Kinoshita, M. 1997. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 96: 509-516.
69. Walsh, K. P., Williams, T. D., Spiteri, C., Pitts, E., Lightman, S. L. and Sutton, R. 1988. Role of atrial pressure and rate in release of atrial natriuretic peptide. *Am. J. Physiol.* 254: R607-610.
70. Witthaut, R. 2004. Science review: natriuretic peptides in critical illness. *Crit. Care.* 8: 342-349.

71. Yoshimura, M., Yasue, H., Okumura, K., Ogawa, H., Jougasaki, M., Mukoyama, M., Nakao, K. and Imura, H. 1993. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 87: 464-469.
72. Zimmering, T. M., Hungerbühler, S., Meneses, F., Nolte, I. and Simon, D. 2010. Evaluation of the association between plasma concentration of N-terminal proatrial natriuretic peptide and outcome in cats with cardiomyopathy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 237: 665-672.
73. Zimmering, T. M., Meneses, F., Nolte, I. J. and Simon, D. 2009. Measurement of N-terminal proatrial natriuretic peptide in plasma of cats with and without cardiomyopathy. *Am. J. Vet. Res.* 70: 216-222.

**Investigation of basic and clinical implications of plasma atrial natriuretic peptide measurement in cats**

Yasuhiro Heishima (Heisei Animal Hospital)

**Introduction**

Cardiac biomarkers are proteins or hormones that are produced in the heart and secreted or released into the blood. Several hormones and peptides, including atrial natriuretic peptide (ANP) and cardiac troponin, are used in veterinary practice as cardiac biomarkers. ANP is mainly synthesized and stored in the atrial myocardium as a prohormone and cleaved into two segments in response to wall stretching. N-terminal proANP and biologically active C-terminal ANP are released into the blood from the left atrium. Previous studies have demonstrated that elevated left atrial pressure is significantly associated with an increase in plasma ANP in dogs and cats. In addition, increases in circulating ANP levels reflect the severity of chronic heart failure. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is most commonly seen in cats. Although an echocardiographic examination is the gold standard for diagnosing cardiomyopathy, the main limitation of this method is that it requires dedicated equipment and a high level of skill. Therefore, establishment of a simple method for diagnosing feline cardiomyopathy is required. However, basic information about potential feline ANP assays is lacking, and only a few studies have evaluated the clinical implications of plasma ANP measurement in cats. This study established an ANP assay system in cats and defined the diagnostic accuracy of using plasma levels of ANP to identify cardiomyopathy severity in cats.

**[Chapter 1]**

To investigate whether the human  $\alpha$ -ANP kit can be applied to measure feline ANP, dilution detection and storage stability were evaluated using feline plasma. Plasma levels of ANP were determined using a chemiluminescence enzyme immunoassay. A plasma sample from a cat with heart failure was serially diluted, and parallelism was confirmed with a human ANP standard. Next, to evaluate the storage stability of ANP, changes in ANP levels in the

sample stored at room temperature was evaluated. Serum levels of ANP markedly decreased from baseline over time, whereas the levels in plasma containing aprotinin did not decrease until 12 h. Finally, the relationship between the storage temperature of the sample and the ANP measurement was evaluated. Plasma levels in samples stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  were similar to those at baseline for 14 days. Similarly, ANP levels were maintained for 7 days in samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . By contrast, plasma levels stored at  $4^{\circ}\text{C}$  decreased to 93.3% of baseline after 1 day, and decreased significantly to 57.6% and 18.0% after 7 and 14 days of storage, respectively. These results suggest that aprotinin should be routinely added to blood samples and that plasma samples should be immediately frozen.

## **[Chapter 2]**

To investigate the influence of hemodynamics on plasma levels of ANP in cats, we analyzed the relationship between blood pressure and ANP levels in the blood of healthy anesthetized cats. Plasma levels of ANP decreased rapidly and significantly during anesthesia. In addition, the levels were significantly correlated with systolic arterial pressure ( $r = 0.59$ ) and mean arterial pressure ( $r = 0.56$ ). These results suggest that excitement or systemic blood pressure may affect plasma levels of ANP in cats.

## **[Chapter 3]**

This study included 78 clinically healthy cats and 83 cats with cardiomyopathy. We investigated the cutoff values of plasma ANP as an indicator of the cardiomyopathy severity. Diseased cats were divided into asymptomatic cats without left atrial dilation, asymptomatic cats with left atrial dilation, and cats experiencing heart failure. The plasma levels of ANP in clinically healthy cats was 43.3 (interquartile range 33.0–56.3) pg/mL. The values were significantly higher in cardiomyopathic cats with left atrial dilation and heart failure. A level of  $\geq 77.5$  pg/mL indicated cardiomyopathy without left atrial dilation with a sensitivity of 66.3% and a specificity of 84.6%. The use of plasma levels of ANP  $> 110.9$  pg/mL to identify cats with left atrial dilation had a sensitivity of 73.6% and specificity of 93.5%. To identify cats with heart failure, a cutoff value of 118.6 pg/mL resulted in good sensitivity (85.2%) and specificity (85.1%). The areas under the ROC curve were 0.80, 0.86, and 0.87, respectively. These results suggest that plasma levels of ANP reflect left atrial dilation associated with cardiomyopathy, and are a useful predictor of left atrial dilation induced by cardiomyopathy.

### **[Conclusions]**

These results indicate that a mouse anti-human ANP monoclonal antibody has an affinity towards feline ANP. In addition, the results indicate the importance of routinely using aprotinin during blood collection to measure feline ANP, and suggest that feline plasma samples should be frozen immediately at  $-20^{\circ}\text{C}$  or less and assayed within 7 days. Systemic blood pressure also affected plasma levels of ANP in cats; therefore, blood should be collected at rest to obtain accurate ANP measurements. Finally, ANP levels increased concomitantly with increased cardiomyopathy severity. An ANP level  $> 77.5$  pg/mL was predictive of cardiomyopathy, and levels  $> 110.9$  pg/mL were predictive of cardiomyopathy with left atrial dilation. Although an ANP measurement alone cannot be used to diagnose any cardiac disease, such data may provide supportive information for assessing the severity of cardiomyopathy.