

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 平島 康博

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 准教授 堀 泰智（循環器病学）

副査 教授 中出 哲也（画像診断学）

副査 教授 山下 和人（獣医麻酔学）

## 学位論文要旨

### 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

平島 康博 (平成動物病院)

【はじめに】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、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)や心筋トロポニンが臨床応用されている。この中で、ANP は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おり、心房筋が伸展すると血中に放出される。イヌ・ネコの血中 ANP 濃度は左心房への負荷を強く反映し、慢性心不全の重症度を反映して増加することが知られている。ネコでは心筋症の発生が多く、心エコー図検査を用いて診断されているが、心エコー図検査を用いた心筋症の診断は技術的制約が強い検査である。従って、簡便な心筋症の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、ネコの心筋症における 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、以下に示す研究を行った。

【第 1 章】ヒト  $\alpha$ -ANP キットがネコ ANP の測定に応用可能かどうかを精査するために、ネコ血漿を用いて ANP の希釈試験ならびに保存安定性を評価した。血漿 ANP 濃度は化学発光酵素免疫測定法によって測定した。ネコの血漿 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 の保存安定性を評価するために、室温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。血清中の ANP 濃度は経時的に有意な低下を示したが、アプロチニン血漿における ANP 濃度は 12 時間後まで低下しなかった。最後に、サンプルの保存温度と ANP 測定値の関係を評価した。-70°C で保存した血漿 ANP 濃度は、14 日後もベースライン(BL)と同等であり、-20°C で保存した血漿 ANP 濃度は、7 日後まで BL と同等であった。一方、4°C で保存した血漿 ANP 濃度は継日的に減少し、1 日後には BL 値の 93.3%、7 日後には 57.6%、14 日後には 18.0%であった。以上のことから、ネコ ANP を測定する際には血液サンプルにアプロチニンの添加が必要であり、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】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。麻酔前に比べて、全身麻酔後には血圧ならびに血漿 ANP 濃度が有意に低下した。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。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】第3章では、健康猫 (78 匹)と心筋症猫 (83 匹)の血中 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。心筋症猫は左心房拡大を伴わない無症候群、左心房拡大を伴う無症候群、心不全群の猫 3 群に分けた。対照群の血漿 ANP 濃度は 43.3 (四分位範囲、33.0–56.3) pg/mL であった。対照群と比較して、血漿 ANP 濃度は左心房拡大を伴う無症候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区別するための血漿 ANP 濃度のカットオフ値は 110.9 pg/mL であり、感度は 73.6%、特異度は 93.5% であった。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、感度は 85.2%、特異度は 85.1% であった。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。

【結論】以上のことから、ヒト  $\alpha$ -ANP キットがネコ ANP に対して交差性を有することが明らかとなった。また、ネコ ANP を測定する際の血液にはアプロチニンの添加が必要であり、猫の血漿サンプルは -20°C 以下で直ちに保存し、7日以内に測定する必要がある。次に、全身血圧は血漿 ANP 濃度に影響する生理学的要因の一つであり、正確な ANP 測定値を得るためには安静時の採血を実施すべきであることが示唆される。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る。

# 論文審査の要旨および結果

## 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

### 論文の概要について

本論文は、心臓で産生され血中に分泌される心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の血中濃度を測定することで、客観的な指標に基づき簡便にネコの心筋症を検出する技術の確立と診断基準を設定するために、一連の研究成果をまとめたものである。論文は3つの章に分けて基礎的・臨床的有用性を検討しており、ヒト用 ANP アッセイ系がネコにおいて利用可能であることを確認したうえで、健康猫における血行動態と ANP の関係や心筋症猫における ANP の変動を詳細に解析している。

### 研究の背景と目的

心筋症はネコにおいて最も頻繁に遭遇する心疾患であり、進行すると心不全や血栓症を合併し予後は非常に悪い疾患である。ネコの心筋症は一般的に身体検査、胸部 X 線検査、心エコー図検査を用いて検査しているが、これらの検査には診断精度や技術的な制約のために見逃す可能性があるため、罹患猫は心不全を発症してから診断されることが多い。一方、ANP は心臓で産生されて血中に分泌されることから、血中濃度を測定することで心臓病の検査法としてヒトやイヌで臨床応用されている。しかし、ネコにおける ANP 測定の基礎的・臨床的意義は十分に解明されていない。本論文では ANP を用いたネコの心筋症の診断・病態評価を最終目標として以下の研究を実施している。

### 研究の成果

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し、アッセイ系の信頼性を評価すると共に、ANP の保存安定性を解析している。まず、心不全猫の血漿 ANP 濃度を2倍階段希釈することでヒト ANP 標準試薬との平行性を確認した。これは、ヒト用に開発されたマウス抗ヒト ANP モノクローナル抗体がネコ ANP に対して親和性を有し、さらに血中濃度を測定可能であることを示唆している。次に、室温保存した血清 ANP 濃度は有意な低下を示したが、アプロチニン血漿では ANP の減少は有意に抑制されていた。最後に、4°C で保存した血漿 ANP 濃度は1日後には大幅な減少を示したが、-20°C および -70°C で保存した血漿 ANP 濃度は7日以上も安定していた。以上のことから、ネコ ANP を測定するにはアプロチニン血漿を用い、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、血中 ANP 濃度に対する血行動態の影響を精査するために健康猫に全身麻酔を実施し、血圧と血中 ANP 濃度の関係を解析している。麻酔前に比べて、麻酔後の血漿 ANP 濃度は有意に減少し、血漿 ANP 濃度は収縮期血圧ならびに平均血圧と有意に相関していた。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

この興奮状態は血中 ANP 濃度に影響することが推察された。

第 3 章では、多施設において症例を収集し、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ている。対照群に比べて、血漿 ANP 濃度は重症度に応じて有意に増加していた。ROC 解析では、心筋症の有無、左心房拡大の有無、心不全の有無をそれぞれ検出するための診断精度を解析しており、左心房拡大を有する心筋症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。これらの結果から、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た。

## 研究の評価

本研究はヒト用 ANP アッセイ系がネコにも応用可能であり、心筋症の検出および重症度評価としての有用性を示した。過去にもネコにおいて ANP または NT-proANP の臨床的意義を研究した報告は散見されるが、大規模に症例を収集し診断精度を明確にした点は特に新規性が高いと判断する。また、既存の検査法と異なり、採血だけで心筋症の客観的評価が行えることはスクリーニング検査として利便性の高い検査法である。本研究から得られた意義は臨床獣医師にとっても広く有益な情報であり、獣医学の発展に寄与すると考える。

## 学位論文の一部を公表した論文

- Heishima Y, Hori Y, Chikazawa S, Kanai K, Hoshi F, Itoh N. Influence of storage conditions on in vitro stability of atrial natriuretic peptide and of anesthesia on plasma atrial natriuretic peptide concentration in cats. *Am J Vet Res.* 2016;77(8): 854-859.
- Heishima Y, Hori Y, Nakamura K, Yamashita Y, Isayama N, Kanno N, Katagi M, Onodera H, Yamano S, Aramaki Y. 2018. Diagnostic accuracy of plasma atrial natriuretic peptide concentrations in cats with and without cardiomyopathies. *J Vet Cardiol.* 2018;20(4): 234-243.

上記 2 編の公表論文が学位論文を構成しており、いずれも筆頭著者である。

以上のことから、平島 康博 氏は、博士 (獣医学) の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2018年 9月18日

### 審査委員

副査 准教授 堀 泰智  
副査 教授 中出 哲也  
副査 教授 山下 和人