

4)。

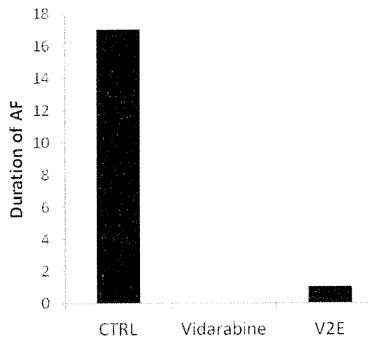


図4：経食道頻回刺激心房細動モデルの薬剤非投与（CTRL）、ピダラビン投与、V2E投与群での心房細動持続時間に与える影響 (N=2)

さらに、Vanderbilt大学のDr. Knollmanらが心室性不整脈のモデルとして確立し、最近我々に提供していただいたCasq2KO (*J. Clin. Invest.* 116, 2510–2520, 2006)を用いて運動負荷VPCの発症率を解析したところ、Vidarabineを投与したマウスではコントロールマウスと比較してVPCが有意に減少するというデータを得ることができた（図5）。

用いて運動負荷VPCの発症率を解析したと

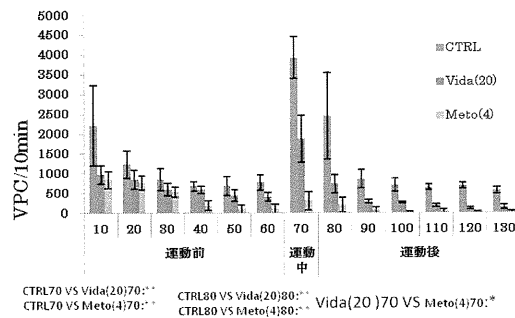


図5：Casq2KOの運動負荷誘発性心室性不整脈に対するピダラビン (20mg/kg/day)、メトプロロール (4mg/kg/day) の抑制効果

Casq2KOの運動負荷誘発性心室性不整脈抑制作用は既存のベータ遮断薬であるメト

プロロールでも確認された。

ビダラビンならびにメトプロロールの心機能に与える影響について検討したところ、メトプロロール投与マウスではベースライ

ンの心機能が、投与後5時間まで有意に低下したのに対して、ビダラビン投与マウスでは心機能低下が見られなかった(図6)。

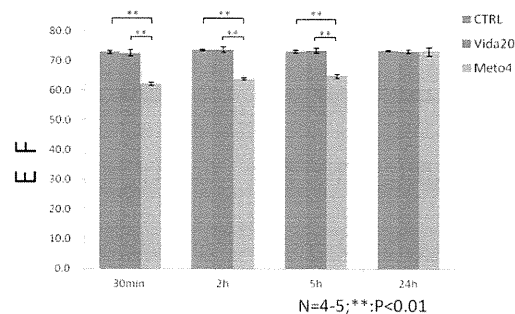


図6 : ビダラビン(20mg/kg/day)、メトプロロール(4mg/kg/day)投与後の心機能 (EF:ejection fraction 心拍量)

以上の予備実験データから研究代表者は

抗ヘルペス薬(ビダラビン)は有用な抗不

E. 結論

我々は複数の5型サブタイプ選択的抑制薬を複数同定し(JBC 2004)、この中には市販の抗ヘルペス剤(ビダラビン)が含まれていた。ビダラビンは抗ヘルペス剤として1984年に臨床利用が開始されており、安全性試験などの前臨床試験を繰り返す必要はないが、新しい適応に対して臨床試験を開始するのに十分な薬理実験データが必要であった。そこで本助成を受け初代培養系における心筋細胞レベルならびにマウス心不全モデル(慢性カテコラミン負荷、急性心筋梗

整脈薬になると考えられる。

塞)を用いた薬理実験データから5型サブタイプ選択的抑制薬は既存のβ遮断薬と同等の心不全治療効果をもつことを明らかにした。

ビダラビンは水溶性が低く脂溶性であるため中枢神経系への副作用が懸念される。したがって水溶性が高くかつビダラビンと同等の5型サブタイプ選択的抑制作用をもつ薬剤は心臓に対する治療効果が高いと予

測される。そこで、有機化学を専門とする横浜国立大学工学部 井上誠一らと共同で水溶性を高めた3種類の新規AC5抑制薬（化合物 V2E, V3E, V5Eと称する）の合成を依頼した。これらの化合物はピダラビンに比較して水溶性がきわめて高く、中枢移行性がない。またピダラビンと同程度に心不全発症ならびに不整脈抑制効果があることが明らかになった。我々はすでにヒトへの投与が認可されている抗ヘルペス剤（ピダラビン）について、不整脈ならびに心不全に対する医師主導型臨床試験を行い、心不全ならびに不整脈治療薬についての新規適応を取得をめざすとともに、次世代の特異的心臓型抑制剤として新規化合物の臨床応用を目指していく。

心房細動 (AF: Atrial Fibrillation) は臨床的に最も一般的に見られる頻脈性不整脈であり、わが国におけるAFの有病率は全人口の0.86%を占め、その発症率は加齢とともに増加し80歳以上では3.2% (男性は4.4%)

に達する。高齢化および生活習慣の変化にともない、AF患者数は今後増加することが予想され2050年には全人口の1.1%にのぼると予測されている (*Int. J. Cardiol.* 137, 102-107, 2009)。心房細動の発症により、動悸、胸痛や心機能低下に伴うQOL (Quality of Life) の低下がもたらされるほか、心原性血栓塞栓症を併発するリスクが高く、その治療の必要性は極めて高い。一方、心室性期外収縮 (VPC: Ventricular Premature Contraction) も高頻度に見られる不整脈であり、特に高齢者に多く認められる。また、これらの不整脈は手術後など交感神経が過剰に亢進した状態で頻繁に発症する。 β -AR遮断薬 (ベータ遮断薬) は虚血性心疾患や高血圧の治療薬として頻用されてきたが、抗不整脈薬としてもVaughan Williams分類III群薬に分類される。ベータ遮断薬は大規模臨床試験の結果、患者の長期的予後を改善する。唯一の抗不整脈薬であるが、副作用として導入時の心機能抑制や持続的な肺機能抑制が見られる。このよ

うなベータ遮断薬

による呼吸器系への副作用は、 β -ARには3種類
のサブタイプしかなく、発現の臓器特異性が比較的低いことがその原因として挙げられる。すなわち、肺にも心臓と同型の β -ARが発現しているため、ベータ遮断薬による呼吸機能抑制が発現する。一方、ACは9種類のサブタイプが存在し β -AR以上の特異性を持って各臓器に発現しているため、例えば心臓型AC5を選択的に抑制することができれば、肺への副作用なくベータ遮断薬と同等の効果を期待できる。その可能性を裏付けるごとく、我々は既存の抗ヘルペス薬(Vidarabine)がAC5選択的な抑制作用を持ち、本薬剤が正常心機能を抑制することなくカ

異性が

テコラミン誘発性心不全の発症を抑制することを平成21-22年度に明らかにし平成23年度は同薬剤が不整脈の発症も抑制することを明らかにした。

アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプを持つため、それぞれのサブタイプが創薬の対象となり、既に世界各国で薬剤開発が行われ、英国では睡眠障害を対象として脳型サブタイプの阻害剤開発が進んでいる。心臓型サブタイプ抑制剤の開発は、高齢者に向けた副作用の少ない薬としてだけでなく、我々の長年の研究成果に裏づけされたコンピュータによる予測技術を含めて、次世代の創薬手法の代表例となることが考えられ、わが国に普及を目指していきたい。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato M, Jiao Q, Honda T, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Takeya T, Mina

misawa S, Lanier SM, Ishikawa Y: Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is requir

ed for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes: Role of β and connexin 43 (CX43)

J Biol Chem **284**, 31431-31440, 2009

2. Okumura S, Suzuki S, Ishikawa Y: Effects of targeted disruption of the type 5 adenylyl 5 cyclase Gene (Review).

J Pharmacol Sci, **109**, 354-359, 2009

3. Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, Ishikawa Y:

Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice.

Am J Physiol Cell Physiol, **298**; C442-C445, 2010

4. Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S: Secretoglobin 3A2 suppresses bleo-

mycin-induced pulmonary fibrosis by transforming growth factor β signaling down-regulation. *J Biol Chem* **286**, 19682-19692, 2011

1

5. Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cisowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y: Identification of transforming factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of G β ₁₆.

J Biol Chem **286**, 17766-17776, 2011

6. Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: The role of cytochrome p450 in ischemic heart disease. *Curr Drug Metab* **12**, 526-532, 2011

H. 学会発表

1) Okumura S, Jin M, Bai Y, Suzuki S, Xuan X, Cai W, Hidaka Y, Kurotani R, Yokoyama U, Ishikawa Y: Epacl protects heart from lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by inhibiting the Toll-like receptor 4 signaling pathway
American heart Association Scientific

Scission 2009 Orlando, USA

2) Meihua Jin, Satoshi Okumura,
Wenqian Cai, Yuko Hidaka, Yoshihiro
Ishikawa: Disruption of Epac1 Gene Preserves
Cardiac Function against Pressure Overload
and Chronic Catecholamine Stress
第87回日本生理学会大会
(2010年 5月 盛岡)

3) Satoshi Okumura, Wenqian Cai, Meihua
Jin, Bai Yunzhe, Takashi Tsunematsu, Yu
ko Hidaka, Reiko Kurotani, Yoshihiro Ishi
kawa: Disruption of Epac1 Protects Heart fro
m Catecholamine-mediated Cardiac Fibrosis.
第75回日本循環器学会学術集会 (2011年3
月 横浜)

1) (発表者) Satoshi Okumura, Meihua Ji
n, Fumika Kawamata, Hui-Ling Jin, Wenqi
an Cai, Yunzhe Bai, Kenji Suita, Yuko Hi
daka, Takashi Tsunematsu, Yoshihiro Ishika
wa
(題名) Epac activation protects heart from i
nterleukin-6-induced cardiac dysfunction by
inhibiting STAT/iNOS signaling
(会名) American Heart Association Scientif
ic Sessions 2011
(場所) Orlando in USA
(年) November 2011

2) (発表者) Okumura S, Cai W, Jin M,

Bai Y, Tsunematsu T, Hidaka Y, Kurotani R,
Ishikawa Y:

(題名) Disruption of Epac1 Protects Heart
from Catecholamine-mediated Cardiac Fibros
is.

(会名) 第75回日本循環器学会学術集会

(場所) 横浜

(年) 2011年8月

3) (発表者) Kawamata F, Okumura S,

Yokoyama U, Ishikawa Y:

(題名) Activation of Epac Signaling Protects

Cardiac Myocyte from Cytokine-mediated

Cardiac Dysfunction through the Inhibition of

Proinflammatory Cytokine Signaling

(会名) 第88回 日本生理学会大会

(場所) 横浜

(年) 2011年3月(震災のため誌上開催)

I. 賞罰

1) 奥村 敏 平成22年度神奈川県バイオ
関連研究シーズ事業化促進事業採択：心臓
型アデニル酸シクラーゼを治療標的にする
心不全治療薬の開発

2) Satoshi Okumura was selected as the

International Fellowship of the Basic
Cardiovascular Sciences at American
Heart Association (FAHA) Scientific
Scission 2010 in Chicago

会 奨励賞受賞

(会名) 東京

(年) 2011年12月

3) (発表者) 奥村 敏、川又史佳、金慧伶、
蔡 文情、金美花、日高祐子、吹田憲治、岩
坪耕策、石川義弘

(題名) 心臓型アデニル酸シクラーゼ選択
的抑制薬を用いた新しい心不全治療

(会名) 第6回 高血圧と冠動脈疾患研究
「ビダラビンによる心房細動治療」
PCT国際出願準備中

2. 実用新案登録
なし

K. 今後の研究課題

心臓型アデニルシクラーゼ抑制剤の作用機序の 解明

ベータアドレナリン受容体 (β -AR) シグ
ナルの主要な構成因子であるアデニル酸シ
クラーゼ (AC) には9つのサブタイプ (1型-9
型) の存在が報告され、各サブタイプは固
有の発現部位ならびに生化学的特徴を有す
る (*Annu Rev Pharmacol Toxicol*

J. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国内特許

1) 「アデニル酸シクラーゼの活性調節剤
」特願2010-240301

2) 「ビダラビンによる心房細動治療」特
願2011-222421

国際特許

「アデニル酸シクラーゼの活性調節剤」
PCT/JP2011/74098

41, 145-174, 2001)。研究代表者は心臓に特
異的に発現するACのサブタイプ (5型
AC: AC5) のノックアウトマウス (AC5KO)
を作製した (Okumura S et al. *Circ Res*
93, 364-371, 2003)。AC5KOの心臓膜タンパ
クのAC活性は、コントロールマウス (WT;

wild type) に比較して約30%低下していた。AC5K0は当初の予測に反して定常状態では正常心機能を示し、大変興味深いことに、種々の心不全誘導ストレス刺激に対して抵抗性を示した。すなわちAC5K0を用いて胸部大動脈狭窄 (TAC; transverse aortic constriction) による慢性圧負荷刺激心不全マウスモデルを作成したところ、AC5K0ではWTに比べて心不全発症が抑制され (Okumura S et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9986-9990, 2003)、イソプロテレノール (ISO) を用いた慢性カテコラミン刺激心不全マウスモデルにおいても AC5K0 では心不全発症が抑制された (Okumura S et al. *Circulation* 118, 1776-1783, 2007)。また AC5K0の加齢に対する影響について検討したところ、生後30ヵ月までの生存率はWTではわずかに16%であったが、AC5K0では92%ときわめて高い生存率を示し、加齢に伴う

筋細胞から遊離される炎症性サイトカインの重要性が指摘されている (*Circ Res* 99, 891-899, 2006; *Circ Res* 105, 1149-1158, 2009)。一方大規模臨床試験からベータ遮断薬が長期予後を改善する有用な心不全治療薬であることが明らかにされ、心不全

心臓リモデリグ形成 (心肥大、心臓線維化、アポトーシス) はWTに比較してAC5K0では有意に抑制されていた (*Cell* 130, 247-258, 2007)。また経食道ペーシングによる心房頻回刺激で誘導される一過性心房細動 (*Circ Res* 97, 62-69, 2005) の持続時間がAC5K0ではWTに比較して有意に抑制されていた (論文投稿中、特願2011-222421)。なおもう一つの心臓型AC (6型AC: AC6) は心不全発症に対しては AC5 とは逆に抑制的に作用することが米国の研究グループから報告されている (*Circulation* 114, 388-396, 2006; *Circulation* 105, 1989-1994, 2002)。

近年心不全の発症ならびに進展に重要な心臓リモデリグにマクロファージならびに心

治療の第1選択薬として広く臨床応用されている (ACC/AHAガイドライン2005)。以上の事実とAC5K0の解析結果から、研究代表者は AC、とくにAC5により産生されるcAMP依存的に活性が制御される心臓リモデリグ制御因子が存在し、この制御因子がcAMPによ

り活性化されると炎症性サイトカインによる心臓リモデリング形成過程は促進され、逆にベータ遮断薬の投与やAC5の欠損により心筋細胞内のcAMP産生が低下し心臓リモデリング制御因子の活性が抑制されると心臓リモデリング形成過程は抑制されるという仮説を考えた。

AC5KOが心不全誘導ストレスに対して抵抗性を示し、心不全発症が抑制される分子メカニズムとしてアポトーシス抵抗性 (Raf/MEK/ERK経路やAkt経路の活性化、抗Bcl-*Science* 282, 2275-2279, 1998) に着目しEpacの2種類のサブタイプ (Epac1, Epac2) のノックアウトマウスを作成した。心臓型アデニル酸シクラーゼ抑制薬の心不全ならびに不整脈抑制作用メカニズム

2の発現上昇) や酸化ストレス抵抗性 (Superoxide dismutaseの発現上昇) を我々はこれまで報告してきたが (*PNAS* 2004, *Circulation* 2007, *Cell* 2007)、これらの心臓保護シグナルとcAMPを結び付ける分子メカニズムについての詳細な解析は行っていない。cAMPの内因性リガンドとしてプロテインキナーゼA (PKA) が従来知られているが、活性酸素の産生がPKA 非依存的に行われるという報告もあり (*Diabetes Metab* 32:331-335, 2006) 研究代表者はcAMPにより活性化される新しい β -ARシグナルの構成因子Epac (exchange protein directly activated by cAMP) (*Nature* 396, 474-477, 1998 ;

について心臓の主要なサブタイプであるEpac1のノックアウトマウス (Epac1KO) を用いて、サイトカインによる心臓リモデリング形成過程にはたずEpac1の役割を *in vivo* と *in vitro* で検討する予定である。

上地 正美 (研究分担者)

ビダラビンの心機能への影響に関する研究

日本大学 生物資源科学部 獣医学科 教授 上地正実

研究要旨

目的：AC5は心臓に主要なアデニル酸シクラーゼのサブタイプであり、AC5KOマウスは心機能の改善を認めている。そこでAC5阻害剤であるビダラビンの心不全モデル犬に対する心機能への影響について検討した。

方法：健常ビーグル犬(n = 13)において高頻度右室ペーシングを用いて心不全モデルを作出し、コントロール群およびビダラビン群、カルベジロール群に無作為に群分けを行った。ビダラビン投与群は24mg/kg/dayにて静脈内投与を行い、カルベジロール群は1 mg/kg/dayにて経口投与を行った。心不全作出中および心不全時、薬物投与7日および10日に各種検査を行った。

結果：ビダラビン群およびカルベジロール群において左室内径短縮率の改善が認められた。また、ビダラビン投与群において血液検査および病理組織学的検索上、肝臓および腎臓、肺に対して影響を認めなかった。

考察：ビダラビンは副作用をほとんど認める事なく、 β 遮断薬であるカルベジロールと同程度の心機能の改善を導く薬剤であると考えられた。今後、心不全治療の新たな薬剤として期待される。

研究目的

過剰な交感神経活性は心不全の悪化を助長する。交感神経が活性化されると交感神経の神経終末よりノルアドレナリンが放出され、心筋細胞および洞房結節細胞の β 受容体を刺激する。刺激された β 受容体はGs蛋白質およびアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化し、心臓の陽性変時作用および陽性変力作用を引き起こす [1]。

β 受容体シグナルの下流に存在するACには9つのサブタイプが存在する事が知られており、なかでもアデニル酸シクラーゼタイプ5 (AC5)は心臓の主要なACの一つである [2]。AC5を特異的にノックアウトしたマウス (AC5KO)の報告において、心不全に伴う収縮力の減少の抑制や心筋アポトーシスの減少といった心筋保護効果が認められている [3]。また、AC5KOは加齢に伴う心筋の肥大や線維化、アポトーシスといった心臓に対する有害作用がワイルドタイプのマウスに比較して減少しており、さらには生存期間の延長に関与する事が報告されている

[4]。以上の事から、心不全の病態や心筋障害にAC5が重要な役割を担っている事が示唆されている。

また、AC5を特異的に抑制するPMC-6は β 作動薬であるイソプレナリンによって誘導される心筋アポトーシスを抑制する事が報告された [5]。一方、ヘルペスウイルスなどのDNAウイルスに対する抗ウイルス薬として知られているビダラビン [6]は、コンピュータプログラムを用いた解析によりAC5を特異的に抑制する作用を有する事が明らかとなった。そのため、ビダラビンはPMC-6同様、過剰な交感神経活性による心筋障害を抑制し、さらには心不全時の交感神経活性を抑制する薬として β 遮断薬と同様な効果が期待される。しかしながら、心不全の病態に対するビダラビンを用いた報告はない。そこで我々は、高頻度ペーシングにて誘発した心不全モデル犬にビダラビンを投薬する事により、ビダラビンの心機能への影響および副作用等を検討するとともに、ビダラビンの効果を β 遮断薬と比較検

討した。

材料および方法

1. 供試動物

日本大学生物資源科学部獣医内科学研究室にて飼育していたビーグル成犬13頭(雌、1歳2ヵ月～5歳9ヵ月齢)を用いた。供試犬はペースングワイヤー埋め込み前に、身体検査、血液検査、心電図検査、血圧検査、X線検査、心臓超音波検査にて健常である事を確認した。なお、これらの犬は日本大学生物資源科学部動物実験指針および手引きに従って飼育管理した。

2. ペースングワイヤーの埋め込み

硫酸アトロピン(アトロピン硫酸塩注射液、扶桑薬品工業株式会社、大阪、日本) 0.025 mg/kg(SC)、メロキシカム(メタカム®0.5%注射液、ベーリンガーインゲルハイムベトメティカジャパン株式会社、東京、日本) 0.2 mg/kg(SC)、ミダゾラム(ドルミカム®注射液10 mg、アステラス製薬株式会社、東京、日本) 0.2 mg/kg(IV)、酒石酸プト

ルファノール(ベトルファール®、明治製菓株式会社、東京、日本) 0.2 mg/kg(IV)を前投与した後、プロポフォール(最大量: 4 mg/kg、IV)にて導入した。麻酔導入後、気管挿管を行い、イソフルラン(イソフル®、大日本住友製薬株式会社、大阪、日本)にて維持した。麻酔後は左側横臥位にて保定し、右側胸部を剃毛、消毒した。右側第四肋間より常法に従い開胸後、心膜を切除し、心臓を露出させた。その後、右室心外膜側よりペースングワイヤー(ペースングワイヤー BM604A、株式会社トライテック、東京、日本)を心筋内に刺入し、電極部位を心筋内に埋入した。ペースングワイヤー遠位端は右側胸部上方より胸腔から引き出し、皮膚に固定した。ペースングワイヤー設置後は胸腔ドレーンを設置し、常法に従い閉胸を行った後、麻酔より覚醒させた。胸腔ドレーンは排液を認めなくなった時点で抜去した。また、手術終了より3日間は抗生剤であるセファゾリンナトリウム(セファメジン®

α注射用、アステラス製薬株式会社、東京、日本)を20 mg/kg (IV)にて一日三回、静脈内投与した。なお、手術後、一週間以上の回復期間を経た後、ペーシングを開始した。

3. 心不全モデル犬の作成

胸腔より引き出されたペーシングワイヤを体外式心臓ペースメーカー(SEP-101、スターメディカル株式会社、東京、日本)に接続した後、250 beats/minにて右室ペーシングを行った(図1)。ペーシングを3週間継続した後、心臓超音波検査を行い、左室拡張末期内径(LVIDd)の増加(> 34 mm)および、左室内径短縮率(FS)の低下(≒ 11%)

を認めた事によって、心不全状態と判断した(図2)。

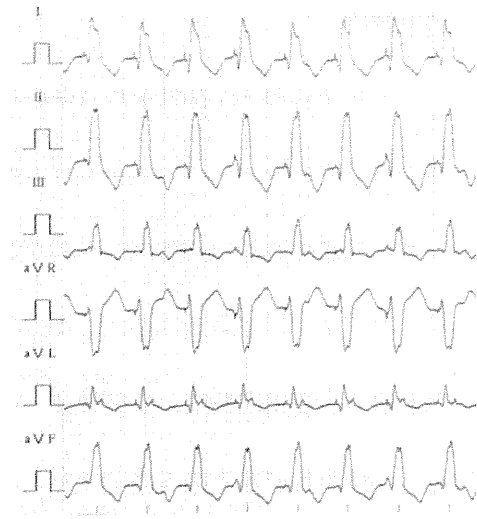


図1 ペーシング中の心電図。50 mm/sec。

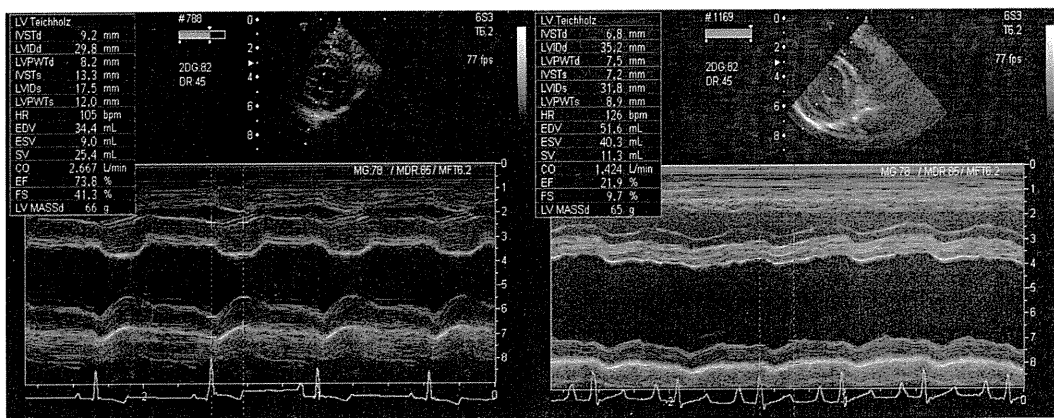


図2 心臓超音波検査におけるペーシング前(左)およびペーシング3週間後(右)の右傍胸骨短軸面乳頭筋レベルにおけるMモード像。²⁸⁾ペーシング3週間において顕著なLVIDdの増加およびFSの低下が認められる。

4. 薬剤の投与

心不全状態となった供試犬をコントロール群(n = 6)、ビダラビン投与群(n = 4)およびカルベジロール群(n = 3)に無作為に群分けを行った。ビダラビン投与群はビダラビン一水和物(東京化成工業株式会社、東京、日本)を生理食塩水に1 mg/mlとなるように溶解し、1 mg/kg/hour(1 ml/kg/hour)にて静脈内投与した。カルベジロール群はカルベジロール(和光純薬工業株式会社、大阪、日本)を1 mg/kg/dayにて毎日AM 9:00に経口投与を行った。一方、コントロール群は生理食塩水を1 ml/kg/hourにて静脈内投与した。投薬はペーシング3週間目より開始し、10日間継続した。なお、ペーシングは3週目より240 beats/minに変更した。ペーシングは4週間にて終了し、後の3日間は非ペーシング下で投薬を行った。

5. 心機能検査

ペーシング前、ペーシング4日、7日、11日、14日、18日、投薬前(ペーシング21日

目)、投薬7日目(ペーシング28日目)、投薬10日目(ペーシング終了後3日目)にてcomplete blood counts(CBC)、血液生化学検査、心電図検査(α 6000 AX-D、フクダ エム・イー工業株式会社、東京)、血圧測定(オシロメトリック法)、胸部X線検査、心臓超音波検査を行った。CBCにおいては白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数を測定した。血液生化学検査はアラニントランスアミナーゼ(ALT)、アスパラギン酸トランスフェラーゼ(AST)、アルカリフォスファターゼ(ALKP)、アルブミン(ALB)、グロブリン(GLOB)、総蛋白質(TP)、総コレステロール(T-CHOL)、グルコース(GLU)、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、カルシウム(Ca)、リン(P)、C反応性蛋白質(CRP)の13項目を測定した。心電図検査(α 6000 AX-D、フクダ エム・イー工業株式会社、東京)では不整脈の有無およびP波、Q波、R波、S波、T波の電位高、PR間隔、QRS間隔、QT間隔を測定し

た。さらに、QT間隔はRR間隔に左右されるため、 $QT_c = QT / \sqrt{RR}$ の公式にて補正した。血圧測定は間接測定法のひとつであるオシロメトリック法(BP-100D、フクダ エム・イー工業株式会社、東京)にて測定し、カフは全頭において尾の基部に巻き付けた。胸部X線検査においては心拡大の評価を行った。評価方法はBuchanan JW et al. [7]の方法に従い、胸部X線右側面像における心臓陰影の長軸および短軸径と椎骨の径を比較する椎骨心臓サイズ(VHS)を用いた(図3)。また、胸部X線背腹像において心胸郭比を測定した。心臓超音波検査(APLIO SSA-770A、東芝メディカルシステムズ株式会社、栃木)においてはLVIDd、左室収縮末期内径(LVIDs)、拡張期心室中隔壁厚(IVSTd)、収縮期心室中隔壁厚(IVSTs)、拡張期左室自由壁厚(LVPWTd)、収縮期左室自由壁厚(LVPWTs)、1回拍出量(SV)、心拍出量(CO)、肺動脈流速、大動脈流速、左房大動脈径比(LA/Ao)を測定した。また、LVIDdおよびLVIDsより、FSを算出($FS = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd$)した。

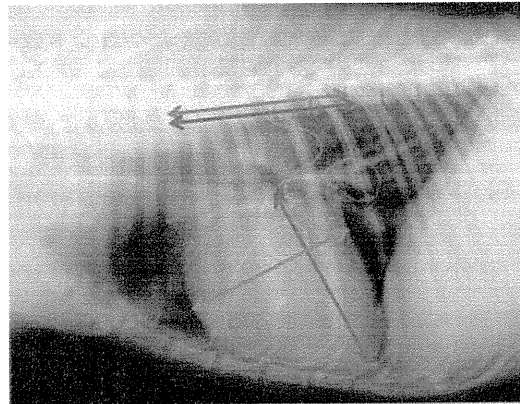


図3 VHS測定例。心臓の長軸径(赤線)および短軸径(青線)のそれぞれの長さが、第四胸椎から何椎体分に相当するかを計測する(赤線:5.3椎体、青線:5椎体)。その後、長軸および短軸に相当する椎体数を足し合わせた物が、この個体のVHSとなる(5.3+5=10.3)。

さらに、ペーシング前、ペーシング7日目、14日目、投薬前(ペーシング21日目)、投薬7日目、10日目において血漿心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)濃度測定、血漿ノルアドレナリン濃度測定を行った。ANPおよびノルアドレナリン測定用の血液は、ペーシン

グ停止後に供試犬を30分以上安静下におき、頸静脈より採取した後、ANP測定用血液はアプロチニン添加EDTA-2Na採血管に、ノルアドレナリン測定用血液はEDTA-2Na採血管に分注した。分注した血液は速やかに3000rpm、10分間、4℃にて遠心した後、血漿を分離し、測定までの期間は-80℃にて保管した。ANP濃度測定にはCLEIA法を、ノルアドレナリン濃度測定にはHPLC法を用いた。

ペーシング前、投薬前、投薬7日目および10日目の検査では、上記の検査終了後、酒石酸ブトルファノール0.1 mg/kgによる鎮静下にて、 β 受容体作動薬であるイソプロテレノール(プロタノールL注、興和創薬株式会社、東京、日本)に対する反応性を評価した。イソプロテレノールは静脈内より投与し、0.02 μ g/kg/min、0.04 μ g/kg/min、0.08 μ g/kg/minへと10分毎に漸増した。イソプロテレノールの各投与量において心拍数、血圧等の値が安定した後、心拍数、FSおよび血圧を測定した。また、上記の測定終了後、ペースメーカーによるペーシング

条件下(210 beats/min)にて、FSおよび血圧を測定した。なお、血圧測定は足背動脈に24 G留置針を挿入し、血圧トランスデューサー(DX-360、日本光電工業株式会社、東京、日本)に接続することによって、測定を行った。

6. 心臓カテーテル検査

投薬10日目における心機能検査終了後、上記の麻酔方法を用いて、心臓カテーテル検査を行った。右側横臥位にて保定後、左側頸部を剃毛、消毒した。頸部を切皮し、頸動脈を確保した。頸動脈に20 Gの留置針を挿入し、ガイドワイヤーを血管内に挿入した。ガイドワイヤー挿入後、留置針を抜去し、ガイドワイヤーに沿わせ、5 Frのシースおよびダイレーターを頸動脈内に挿入した。その後、ガイドワイヤーおよびダイレーターを抜去し、シース内に4 Frの圧測定用カテーテルを挿入した。カテーテルはX線透視装置による透視下にてカテーテルの先端を左心室内に誘導後、左室圧を測定し

た。左室圧測定後は圧カテーテルおよびシースを頸動脈より抜去し、頸動脈を血管縫合後、血液の漏出が無い事を確認した後、皮膚縫合を行った。

7. 剖検

心臓カテーテル検査終了後、麻酔下にて塩化カリウムの静脈内投与により安楽死を行い、心臓、肺、肝臓、腎臓および左右の橈側皮静脈、伏在静脈を摘出した。摘出した心臓は総重量を測定後、左室自由壁、心室中隔壁、右室自由壁、左房壁、右房壁、心房中隔壁に分け、それぞれの重量を測定した。重量測定後、10%中性緩衝ホルマリンまたは液体窒素にて組織を保存した。

8. 病理組織学的隄索

摘出した組織は10%中性緩衝ホルマリンにて24時間固定した後、70%エタノールにてさらに一晩固定した。その後、自動固定包埋装置(サクラ自動固定包埋装置、サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日

本)にて組織内にパラフィンを浸透させ、パラフィン包埋ブロック作成装置(ティシュー・テック TECプラスシステム、サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本)にてパラフィンブロックを作成した。パラフィンブロックは3 μ mにて薄切した後、HE染色およびMasson trichrome染色に供した。HE染色は薄切した切片をキシレンおよびアルコールにて脱パラフィンした後、マイヤーのヘマトキシリン(サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本)およびエオジン(サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本)にて染色し、常法に従い脱水、透徹、封入した。また、Masson trichrome染色は薄切した切片を、HE染色同様脱パラフィンした後、ブアン溶液に一晩室温にて浸水させた。その後、ビーブリッヒスカーレットー酸フクシン溶液にて5分染色し、10%リンタンングステン酸および10%リンモリブデン酸の混合溶液に10分間浸水させた。その後、アニリン青溶液にて十分な染色を得た事を確認した後、1%酢酸に2

分間浸水させ、常法に従い脱水、透徹、封入を行った。

1. 心不全モデル犬作製までのCBCおよび血液生化学検査の変動

・白血球数(図4)

カルベジロール群は他の二群に比較してペースング4から14日目にかけて高値を示す傾向が認められた。コントロール群およびビダラビン群において白血球数の変化はほとんど認められなかった。一方、カルベジロール群においてはペースング7-11日目に2/3頭にて白血球数の異常高値を示す個体が認められたものの、ペースング18日目に全頭正常値となった。

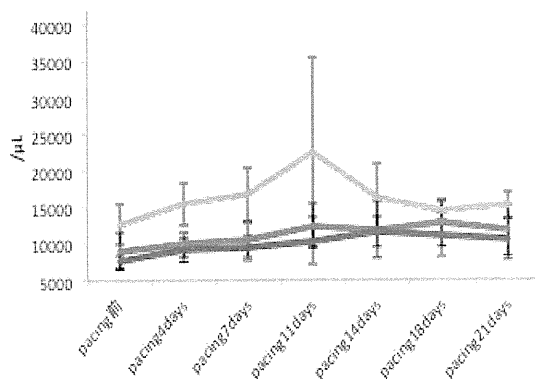


図4 ペースング21日目までの白血球数の変動。青線：コントロール群、赤線：ビダラビン群、緑線：カルベジロール群

・赤血球数(図5)

赤血球数はカルベジロール群において他の二群に比較してペースング7から18日目にかけて高値を示す傾向が認められた。また、コントロール群、カルベジロール群ともにペースング7日目まで上昇する傾向が認められたものの、その後ペースング21日まで低下した。一方、ビダラビン群はペースング4日目に最高値を示し、その後低下を認めた。

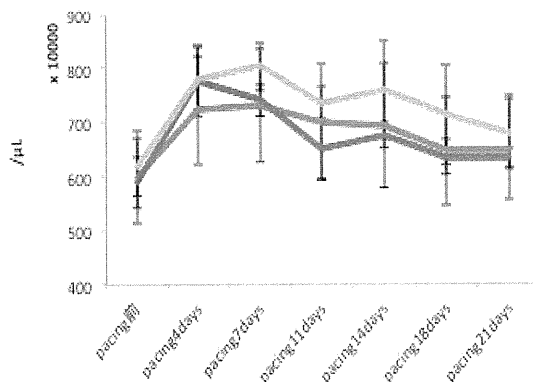


図5 ペースング21日目までの赤血球数の変動。青線：コントロール群、赤線：ビダラビン群、緑線：カルベジロール群

・ヘモグロビン濃度(図6)

ヘモグロビン濃度はコントロール群およびビダラビン群においてペースング4日目に最高値を示し、その後ペースング21日まで低下した。一方、カルベジロール群はペースング7日目に最高値を示し、その後低下を認めた。また、ビダラビン群はペースング4から7日目にかけて、カルベジロール群はペースング7日目においてコントロール群に比較して高値を示す傾向が認められた。

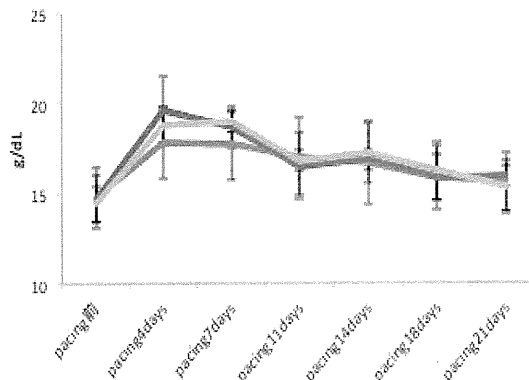


図6 ペースング21日目までのヘモグロビン濃度の変動。青線：コントロール群、赤線：ビダラビン群、緑線：カルベジロール群

・ヘマトクリット値(図7)

ヘマトクリット値はビダラビン群およびカルベジロール群においてペースング4日目に最高値を示し、その後ペースング21日目まで低下した。一方、コントロール群はペースング7日目に最高値を示し、その後低下を認めた。また、ビダラビン群およびカルベジロール群はペースング4日目においてコントロール群に比較して高値を示す傾向が認められた。

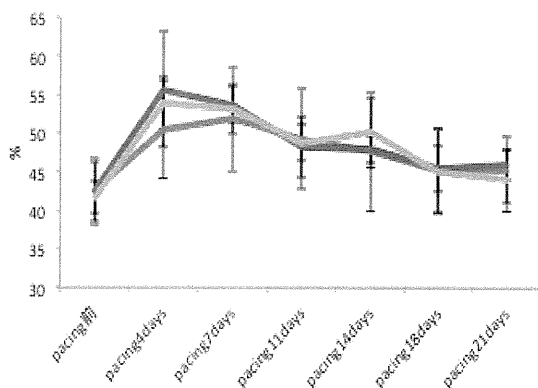


図7 ペースング21日目までのヘマトクリット値の変動。青線：コントロール群、赤線：ビダラビン群、緑線：カルベジロール群

・平均赤血球容積(図8)

平均赤血球容積は三群間において差を認めなかった。また、三群共にペースング期間中の変動を認めなかった。

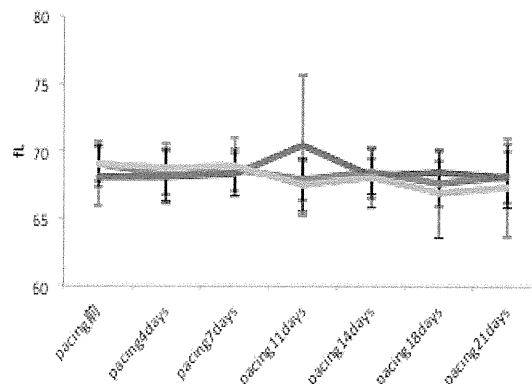


図8 ペースング21日目までの平均赤血球容積の変動。青線：コントロール群、赤線：ビダラビン群、緑線：カルベジロール群

・平均赤血球色素量(図9)

平均赤血球色素量はコントロール群およびビダラビン群にて差を認めなかったが、カルベジロール群は期間中、低値を示す傾向が認められた。また、カルベジロール群はペースング4日から21日目にかけて低下する傾向が認められたが、他の二群において変動を認めなかった。

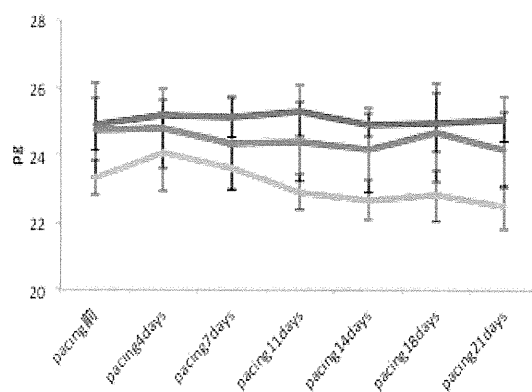


図9 ペースング21日目までの平均赤血球色素量の変動。青線：コントロール群、赤線：ビダラビン群、緑線：カルベジロール群

・平均赤血球色素濃度(図10)

平均赤血球色素濃度はコントロール群お