

ラットにおける血中ナトリウム利尿ペプチドの日内変動及び麻酔の影響について

大野理絵,^{*,a} 宮田裕人,^a 木村正明^b

Circadian Rhythms and Effects of Anesthesia on Plasma Natriuretic Peptide Levels in Rats

Rie OHNO,^{*,a} Hiroto MIYATA,^a and Masaaki KIMURA^b

^aDrug Safety and Pharmacokinetics Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., 1-403 Yoshino-cho, Kita-ku, Saitama 331-9530, Japan, and ^bQA Management Section, Quality Assurance Head Office, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., 3-24-1 Takada, Toshima-ku, Tokyo 170-8633, Japan

(Received June 11, 2009; Accepted September 12, 2009; Published online September 18, 2009)

Atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) are circulating hormones secreted predominantly in patients with hypertension or congestive heart failure. To obtain background data on plasma ANP and BNP levels in rats, we investigated the circadian rhythms and effects of anesthesia on these peptides. To determine the circadian rhythms, plasma samples from thirty rats were collected by non-anesthesia (decapitation) at six time points every fourth hour. To determine the effects of anesthesia, plasma samples from thirty-two rats were collected under diethyl ether, pentobarbital or urethane anesthesia. The plasma ANP and BNP levels were determined using a radioimmunoassay. The plasma ANP levels were high from the evening to early morning, while the plasma BNP levels were relatively low at 2 : 30 AM. The difference in the BNP levels was statistically significant. The plasma BNP levels were relatively high when the rats were anesthetized using urethane. These results suggest that blood collection should be performed between 10 : 30 AM to 2 : 30 PM to determine plasma ANP and BNP. The use of pentobarbital is also recommended for toxicological studies in rats.

Key words—circadian rhythm; anesthesia; brain natriuretic peptide; atrial natriuretic peptide; rat

緒 言

1983–1990年にかけて心房性ナトリウム利尿ペプチド (以下 ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (以下 BNP)、C タイプナトリウム利尿ペプチドが各々単離同定された。^{1–3)}

そのうち、ANP と BNP は共有する Guanylate cyclase-A 受容体に作用し、腎機能、水や電解質バランス等の作用を有し、心臓においてそれぞれ主に心房、心室で合成・分泌されていることから心臓ホルモンと言われている。ヒトにおいて ANP、BNP はナトリウム利尿、利尿作用及び血管弛緩作用を有し、中枢神経系と末梢組織で体液と電解質のホメオスタシスを調節することで心臓を保護する働きを持っている。BNP についてはさらに、ヒトの臨床領域での有用性が広く認められている。⁴⁾ このよう

に心臓ホルモンは臨床では生理的、病態生理学的にも多くの検討がされていると同時に、それらの血中濃度測定は心機能や心負荷の程度を知る優れた生化学的パラメーターとなることが示されている。心肥大を呈する高血圧自然発症ラットにおいては心不全前である心肥大時の圧負荷や容量負荷の状態において心臓ホルモンの分泌が生じ、イソプロテレノールによる心障害モデルラットでは心障害時における ANP 及び BNP の mRNA 量の増加時期の違いについての報告があり、^{5,6)} ラットにおいても血中 ANP と BNP 濃度はその病態 (心機能や心負荷) の程度を知るための有用なバイオマーカーであるとされている。^{7–11)}

ホルモンや酵素等、バイオマーカーとして知られるものの中には、日内に周期的変動を示すものがある。^{12–15)} 例えばラットの ACTH は午後の高値を示し、ACTH やコルチコステロン濃度は照明時間の暗期 (消灯時間帯) の初期に最高濃度になり、暗期中期にかけて急速に減少して最低濃度になる。さ

^a大正製薬株式会社安全性・動態研究所安全性研究室,

^b大正製薬株式会社 QA 本部 QA 推進室

*e-mail: rie.ohno@po.rd.taisho.co.jp

らにラットが夜間に餌を食べる習性から夜間に絶食条件下にするとアルカリ性ホスファターゼ、アルブミン、遊離脂肪酸、ビリルビン及び胆汁酸濃度が減少するとの報告もある。¹⁶⁾ また、採血時の動物に施す麻酔の方法によっては諸検査値に影響を与えることがあり、¹⁷⁻¹⁹⁾ 測定データを解析する際には、種々の影響因子を把握しておくことが重要である。採血は長時間かかるため、麻酔及び日内変動が心臓ホルモンの測定値に影響があるか否かを調べる必要がある。しかし、ラットの心臓ホルモンについては麻酔に関連した報告は極めて少なく、日内変動の報告はない。

本研究では、ラットの心臓ホルモンの背景データ収集の一環として、血中 ANP 及び BNP の日内変動と麻酔による影響を検討した。また麻酔薬の影響については生体への影響をみるために血液生化学パラメーターの変動についても併せて検討した。

材料及び方法

1. 実験動物 本研究には日本チャールス・リバー(株)より購入した CrI:CD (SD) 雄性ラットを用い、一般状態、発育が良好であることを確認した後、試験に供した。各実験群における使用動物数と群分けの内訳は下記 2. の項に示す。動物は温度 20-26°C、湿度 30-70%、照明時間 12 時間/日 (蛍光灯照明、照明時間: 7 時 15 分-19 時 15 分)、換気回数 10 回以上/時間に設定された飼育室内で自動水洗飼育機型ラット単飼育用ケージに単飼育した。飼料 (MF, オリエンタル酵母工業(株)) 及び殺菌水は自由に摂取させた。なお、本研究は、大正製薬株式会社が定める「動物実験に関する指針」に従って行った。

2. 実験条件及び測定方法

2-1. 日内変動 動物は 9 週齢の雄性ラット 30 匹を使用した。ラットの飼育室の照明時間は上記の通り、12 時間のサイクル (明期: 7 時 15 分-19 時 15 分、暗期: 19 時 15 分-7 時 15 分) で設定した。心臓ホルモンの日内変動を検討するために、採血時間は明暗環境下で各々 3 ポイント (計 6 ポイント、5 匹/ポイント) として 10 時 30 分、14 時 30 分、18 時 30 分、22 時 30 分、2 時 30 分、6 時 30 分の 4 時間毎に設定して、ANP 及び BNP の測定を行った。血液は断頭により採取した。採取した血液はア

プロチニン 500 KIU・EDTA-2Na 1 mg/血液 1 ml で処理し、遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 15 min) して得た血漿を用いて前処理後にラジオイムノアッセイ法で行った。

2-2. 麻酔法の違いによる検討 動物は 10 週齢の雄性ラット 32 匹を使用した。下記に示す異なる 3 種の麻酔薬を用いて麻酔による影響を検討した。対照として、断頭により採血する無麻酔群を設定した (8 匹/群)。ただし、血液生化学検査の項目については反復毒性試験で麻酔薬として繁用しているジエチルエーテル群を対照群として設定した。麻酔薬はラットの毒性試験で採血前の麻酔に使用されているジエチルエーテル (デシケータにジエチルエーテルを 20 ml 含ませた吸湿紙を入れて吸入) 及びペントバルビタール (50 mg/ml 液, 0.55 ml/匹投与, i.p.), 麻酔状態を長時間維持できるウレタン (25%カルバミド酸エチル液 1.5 g/kg 投与, s.c.) を選択した。ジエチルエーテルは吸入約 2 分後、ペントバルビタールは麻酔導入約 15 分後、ウレタンは麻酔導入約 1 時間後に、各々腹大動脈から採血した。なおこれらの麻酔量及び採血までの時間はラットが採血に適した状態にあることを確認し、日内変動の影響が少ない時間帯に実施した。麻酔深度は、ラットが規則的な呼吸状態を維持し、かつ起き上がる、頭部を動かす等の動作の消失、動物の目を指で触れた際に瞬きをしない、肢の先を強く指でつまみ動物が動かないことを指標に採血に適した状態であることを確認した。²⁰⁾ ANP 及び BNP 用の血漿サンプルは上記の日内変動と同様の方法で測定した。さらに麻酔薬を用いて採血を実施した (無麻酔群以外の) 動物については、生体への影響をみるために血液生化学検査も実施した。血液生化学検査には抗凝固剤 (ヘパリンリチウム) で処理した採血管 (テルモ(株)) 及び抗凝固剤の入っていない採血管 (テルモ(株)) に採取した後、各々遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 15 min) して得られた血漿及び血清を測定に供した。測定は、自動分析装置 (7070, (株)日立製作所) を用いた。測定項目 (略名, 方法) は、血漿を用いて乳酸脱水素酵素 (LDH, Wróblewski-La Due 法), クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK, GSCC 処方), 血清を用いてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST, JSCC 標準化対応), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT, JSCC 標

準化対応), アルカリ性フォスファターゼ (ALP, JSCC 標準化対応), 尿素窒素 (ウレアーゼ・GIDH 法), クレアチニン (クレアチナーゼ・F-DAOS 法), グルコース (ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法), 総タンパク (ビウレット法), アルブミン (BCG 法), 総コレステロール (コレステロールオキシダーゼ・ESBmT 法), トリグリセリド [GPO・ESBmT (遊離グリセロール消去法)], リン脂質 (コリンオキシダーゼ・POD 法), 総ビリルビン (アルカリアゾビリルビン法), 無機リン (フィスケ・サバロー法), カルシウム (MXB 法), ナトリウム (電極法), カリウム (電極法), クロライド (電極法) とした. なお, 一部の動物では測定に必要な血液量が採取できなかったため測定できない項目があった. 測定項目及びサンプル数については Table 中に表示した.

3. データの解析に使用した統計学的方法

3-1. 日内変動 ANP 及び BNP 値について, 群毎に平均値及び標準偏差を算出し, 多重比較検定法により採血時刻 10 時 30 分とほかの採血時刻との統計学的有意性を検定した. 検定方法は, 最初に Bartlett 法により等分散の検定を行い, 等分散の場合は一元配置分散分析を行い, 採血時刻間で有意差が認められた場合は Dunnett 法 (パラメトリック) により 10 時 30 分とほかの採血時刻の平均値の差の検定を行った. また分散が等しくない場合, Kruskal-Wallis の H 検定を行い, 採血時刻間に有意差が認められた場合は Dunnett 法 (ノンパラメトリック) により 10 時 30 分とほかの採血時刻間の平均値の差の検定を行った.

3-2. 麻酔の影響 ANP, BNP 値及び血液生化学的パラメーターについて, 群毎に平均値及び標準偏差を算出し, 多重比較検定法により ANP, BNP 値については無麻酔群と麻酔群, 血液生化学検査の各項目についてはジエチルエーテル群とほかの麻酔群との統計学的有意性を検定した. 検定方法は, 最初に Bartlett 法により等分散の検定を行い, 等分散の場合は一元配置分散分析を行い, 群間で有意差が認められた場合は Dunnett 法 (パラメトリック) によりジエチルエーテル群とほかの麻酔群の平均値の差の検定を行った. また分散が等しくない場合, Kruskal-Wallis の H 検定を行い, 群間に有意差が認められた場合は Dunnett 法 (ノンパラメトリック)

ク) によりジエチルエーテル群とほかの麻酔群間での平均値の差の検定を行った.

実験成績

1. 日内変動 ANP は日中 (明期) の 67.8 ± 12.1 pg/ml– 81.7 ± 16.9 pg/ml と比較し, 夕方から早朝 (暗期) では 94.0 ± 38.3 pg/ml– 119.2 ± 19.9 pg/ml と高値を示した. BNP については暗期の 2 時 30 分の値が 13.9 ± 1.6 pg/ml と最も低く, 明期の 10 時 30 分の値と比較し有意な減少を示した (Table 1 and Fig. 1).

2. 麻酔法の違いによる影響

2-1. 心臓ホルモン BNP において, ウレタン群では 98.2 ± 68.8 pg/ml と無麻酔群の 30.3 ± 3.3 pg/ml に対し, 有意な高値を示した. ANP 値についてはジエチルエーテル群で高値を示したが, 有意な変動ではなく麻酔薬による明らかな影響は認められなかった (Fig. 2).

2-2. 血液生化学的検査 ジエチルエーテル群と比較しほかの麻酔薬で以下の変動がみられた. ウレタン群ではトリグリセリド, LDH, 総ビリルビン, CPK, カリウム, クロライドの有意な高値を示した. ペントバルビタール群では, 無機リンの有意な高値を示した (Table 2). なお, LDH, 総ビリルビン, CPK, カリウムは溶血により高値を示す可能性があるが, 本実験では遠心分離した上清において溶血は確認できなかった. ウレタン群でみられたこれら項目の高値は麻酔の種類による影響と考えられた.

Table 1. Circadian Rhythm on Plasma Levels of ANP and BNP in Rats

Number of animals	ANP (pg/ml)	BNP (pg/ml)
	5	5
time		
10:30	81.7 ± 16.9	18.8 ± 4.0
14:30	67.8 ± 12.1	21.2 ± 2.3
18:30	94.0 ± 38.3	15.6 ± 1.6
22:30	119.2 ± 19.9	16.0 ± 1.5
2:30	118.9 ± 29.1	$13.9 \pm 1.6^{**}$
6:30	102.9 ± 40.7	16.0 ± 1.6

Each value is mean \pm S.D. for 5 animals per time. **: $p < 0.01$, 10:30 versus other time.

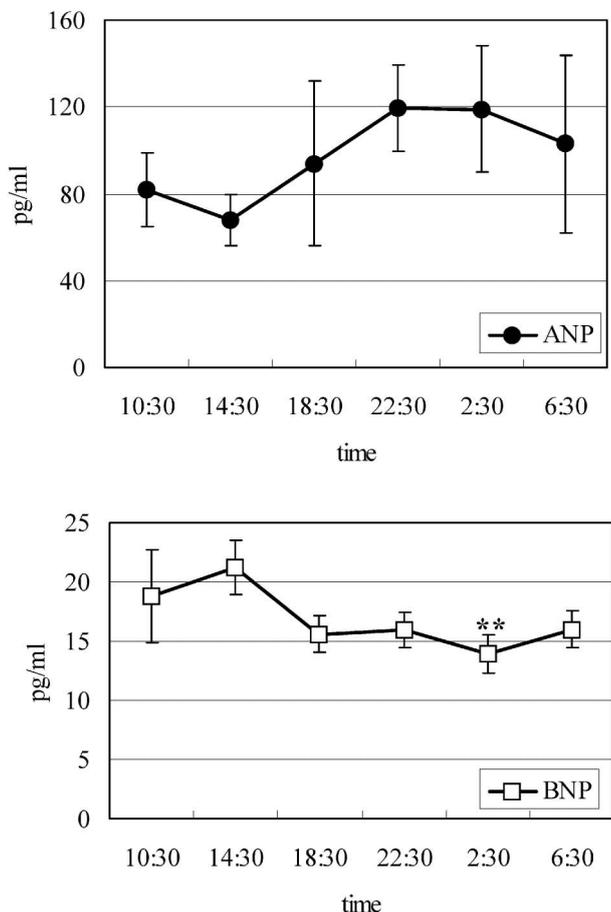


Fig. 1. Circadian Rhythm on Plasma Levels of ANP and BNP in Rats

Each value is mean \pm S.D. for 5 animals per time. **: $p < 0.01$ significance of the differences versus 10:30.

考 察

ANP, BNP はその生理的作用からラットにおいても心機能を評価するバイオマーカーとしての有用性は高い。²¹⁻²³⁾ 今回、医薬品開発におけるラットの反復投与毒性試験に評価パラメーターの1つとして組み入れるための基礎データの収集を目的に、各心臓ホルモンの背景値となる日内変動及び麻酔法の違いによる影響を検討した。

ANP, BNP は主に心房、心室で合成・分泌されるが、心房細胞は合成されたペプチドを顆粒として貯蔵し刺激に応じて分泌するが、心室細胞はペプチドが合成されると貯蔵せず分泌する様式をとる。また代謝あるいはクリアランスは ANP-C 受容体を介する機序及び中性エンドペプチダーゼによる分解を受けることが明らかにされている。

血中 ANP は日内変動を示し、暗期（飼育室の消

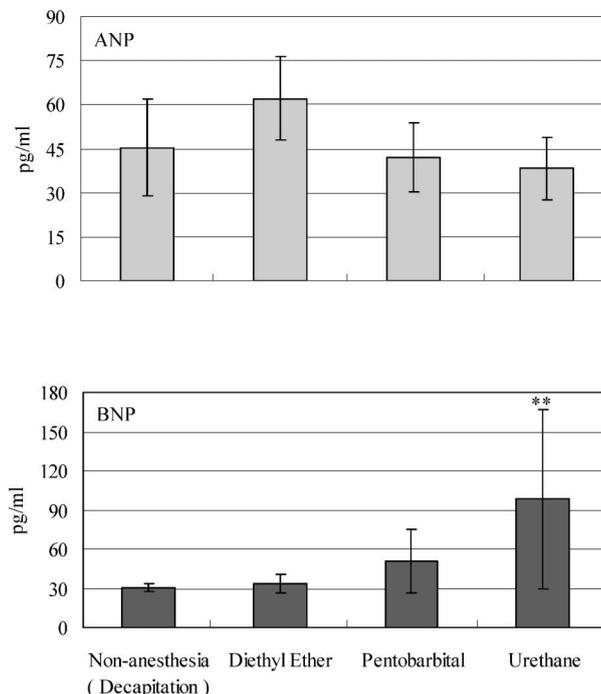


Fig. 2. Plasma ANP and BNP Levels following Anesthesia and Non-anesthesia in Rats

Each value is mean \pm S.D. for 8 animals per group. **: $p < 0.01$ significance of the differences versus non-anesthesia.

灯時間帯)の夕方から早朝にかけて高値であった。ヒトにおける ANP は正常では主として心房で合成・分泌されるが、心不全状態に陥ると心室においても合成・分泌が著増し、心房における合成分泌を上回るとされている。²⁴⁾ ラットにおいても正常では、血中 ANP の上昇は右心房圧と連動しており、圧の上昇に伴い心房壁の伸展受容体が刺激され、心房筋細胞から ANP が分泌されると言われている。²¹⁾ ラットでは摂水に日内変動がみられ、消灯した時間帯(暗期:約12時間)の摂水量は1日の摂水量に対しその90%を占める。^{25,26)} 本研究で供試したラットは正常であり、体液量の増加に対する生体反応として、心房から ANP が分泌され、その機能が十分発揮され、さらに夜間の摂水量の増加に対しては、飲水量に応じて尿排泄量が増加し、体液量を一定に維持していることが予想される。このことから今回の血中 ANP の日内変動は摂水量増加に伴う静脈還流の増加から心房への負荷がかかったため、現われたものと考えられる。一方、血中 BNP は ANP のように高値を示すことはなく、逆に暗期の2時30分に低値を示した。

ANP は心不全以外にも、高血圧、脱水、溢水、

Table 2. Influence of Diethyl Ether, Pentobarbital and Urethane

Number of animals		diethyl ether 8	pentobarbital 8	urethane 8
AST	(IU/l)	78±5 (7) ^a	88±14 (7)	95±22
ALT	(IU/l)	37±5 (7)	40±8 (7)	36±5
ALP	(IU/l)	689±153 (7)	767±193 (7)	683±140
Urea nitrogen	(mg/dl)	19.4±2.0	20±1.6	19.8±1.4
Glucose	(mg/dl)	223±20 (7)	243±28 (6)	214±13 (7)
Total Protein	(g/dl)	5.7±0.2 (7)	5.6±0.3 (7)	5.4±0.3
Albumin	(g/dl)	4.3±0.3	4.2±0.2 (5)	4.2±0.3 (7)
Total Cholesterol	(mg/dl)	56±8	56±9	60±8
Triglyceride	(mg/dl)	41±16	46±17	63±19*
LDH	(IU/l)	355±164	396±131	658±200**
Total Bilirubin	(mg/dl)	0.08±0.02	0.09±0.02	0.12±0.06*
CPK	(IU/l)	181±40	573±267	1559±1524*
Phospholipid	(mg/dl)	110±17	118±12	117±12
Inorganic Phosphorus	(mg/dl)	8.2±0.5	9.4±0.5**	8.3±0.5
Creatinine	(mg/dl)	0.45±0.04	0.46±0.05	0.42±0.05
Calcium	(mg/dl)	9.9±0.5 (7)	10.3±0.3 (6)	9.8±0.6 (7)
Sodium	(mEq/l)	146±1	147±2	147±3
Potassium	(mEq/l)	4.46±0.25	4.03±0.32	5.51±0.57**
Chloride	(mEq/l)	108±2	106±3	112±2**

Each value is mean±S.D. for 6–8 animals per group. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, significance of the differences versus diethyl ether. (): excluding a value of one to three animals because of shortage of serum volume.

腎不全などにおける体液量の指標としても評価されている。血中BNPも体液量などの水分バランスで心臓を保護するために分泌されるが、BNPの場合は特に心室機能の低下に鋭敏に反応して速やかに血中に分泌される。²⁷⁻³⁰⁾ 本研究では夜間の摂水量は増加した可能性が高いが、心室に負荷がかかるような体液量増加が起こらなかったことから、BNPは大きく変動しなかったものと考えられる。ヒトにおいてANPはBNPより食事、体位、運動などによる行動に影響を受け易いとされ、ANPとBNPの分泌様式の違いと圧負荷に対して壁の薄い心房の方が心室よりも伸展を受け易いと報告がある。³¹⁾ ラットは夜行性動物であり、夜間の活動が血中ANPに影響を与えた可能性もあるが、日内変動と生合成、代謝及びクリアランスとの関わりは明らかではない。本研究は毒性試験の評価パラメーターの1つとして評価したものであり、心臓ホルモンの生合成及び代謝と血中濃度の変動については今後の課題である。

本研究ではこのほかに、血液サンプリング（腹大動脈採血）時の麻酔が、血中ナトリウム利尿ペプチドの値にどのような影響を及ぼすかを異なる3種の

麻酔薬を用いて検討した。各麻酔薬とも用量によって心臓ホルモンに対する影響に差が生ずる可能性はあるが、本研究では各麻酔薬とも採血するのに至適な用量を選択していると考えている。^{17,20,32,33)} 今回の結果、ウレタン麻酔では個体間のバラツキが大きいものの、無麻酔（断頭）と比べてBNPの有意な高値を示した。また、同時に測定した血液生化学パラメーターにおいても、ほかの麻酔よりも多くの項目が変動し、生体への明らかな影響が現れた。ウレタンは長時間の麻酔効果が得られるが、発がん性を有し、¹⁷⁾ 麻酔から回復しにくいということから、慢性実験には適さない。これらのことから、ウレタンはラットの反復毒性試験の血中パラメーターを測定する時の麻酔薬としては適していないと考えられる。

一方、ジエチルエーテル及びペントバルビタール麻酔では心臓ホルモンの値や生体への影響は少なかった。ペントバルビタールは腹腔内投与のため、麻酔の量を個体毎に設定できる利点がある。また、動物の健康状態等に応じて投与量の加減が必要になる場合はあるが、採血前に麻酔が足りない場合は追加して投与することで適切な麻酔深度を維持することが可能であることから各種動物実験に広く用いられ

ている。ジエチルエーテルは吸入投与のため、麻酔の導入及び覚醒が緩やかであり、実験者にとって扱い易い麻酔薬である。しかし、ジエチルエーテルは可燃性物質であり、また部屋の換気が悪いとほかの動物や実験者が吸入暴露を受け易いこと等を考慮に入れると、ラットの毒性試験における血中パラメーターの測定にはペントバルビタールの方がより適した麻酔薬であると考えられる。

本研究から、心臓ホルモンは明期の特に10時30分-14時30分の時間帯では日内変動の影響を受ける可能性が少ないことが判明した。本実験では4時間毎に日内変動を確認しているが、今後の毒性試験のためには実際に採血作業を行う昼間の時間帯について詳細な検証を実施していきたいと考えている。また麻酔薬は、ジエチルエーテル及びペントバルビタールでは心臓ホルモンの値や血液生化学パラメーターへの影響を及ぼさないことが明らかになった。ラットの反復毒性試験では使用動物数により全動物の採血に係わる時間が数時間に及ぶことがある。このような試験で心臓ホルモンを測定する場合には、上記結果を踏まえた試験計画を設定する必要があると考えられる。

また、心臓ホルモンについての今後の実験においても、日内変動の存在の可能性と麻酔薬の違いによる結果の違いの可能性を考えて試験計画の組み立て方を慎重に行い麻酔方法を一定にする必要があると考えられる。

REFERENCES

- 1) Kangawa K., Matsuo H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 131-139 (1984).
- 2) Sudoh T., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., *Nature*, **332**, 78-81 (1988).
- 3) Sudoh T., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 863-870 (1990).
- 4) Groenning B. A., Nilsson J. C., Sondergaard L., Kjaer A., Larsson H. B. W., Hildebrandt P. R., *Eur. J. Heart Fail.*, **3**, 699-708 (2001).
- 5) Arai H., Nakao K., Saito Y., Morii N., Sugawara A., Yamada T., Itoh H., Shiono S., Mukoyama M., Ohkubo H., Nakanishi S., Imura H., *Circ. Res.*, **62**, 926-930 (1988).
- 6) Kinnunen P., Vuolteenaho O., Unsimaa P., Ruskoaho H., *Circ. Res.*, **70**, 1244-1253 (1992).
- 7) Liu L., Yoshimi T., *Folia. Endocrinol.*, **71**, 587-596 (1995).
- 8) Itoh H., Nakao K., Mukoyama M., Yamada T., Hosoda K., Shirakami G., Morii N., Sugawara A., Saito Y., Shiono S., Arai H., Yoshida I., Imura H., *J. Clin. Invest.*, **84**, 145-154 (1989).
- 9) Itoh H., Nakao K., Mukoyama M., Arai H., Yamada T., Saito Y., Shiono S., Hosoda K., Shirakami G., Suga S., Imura H., *Am. J. Hypertens.*, **4**, 39-44 (1991).
- 10) Guillaume P., Jankowski M., Gutkowska J., Gianoulakis C., *Eur. J. Pharmacol.*, **316**, 49-58 (1996).
- 11) Shimoike H., Iwai N., Kinoshita M., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **24**, 23-30 (1997).
- 12) Kouguchi Y., Ichihara K., Hamano M., Nakagiri I., Ishida H., Matsuda N., *Rinsho Kensa*, **41**, 345-352 (1997).
- 13) Igawa M., *Nippon Rinsho*, **57**, 338-340 (1999).
- 14) Kanai I., "Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine," ed. by Kanai M., Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, 1993, pp. 469-695.
- 15) Murakami N., *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**, 437-442 (1984).
- 16) Walter F. L., "Clinical Biochemistry of Domestic Animals," 4th ed., ed. by Kaneko J. J., Kindai Shuppan Co., Ltd., Tokyo, 1991, pp. 866-874.
- 17) Flecknell P., "Laboratory Animal Anaesthesia," Gakusosha Co., Ltd., Tokyo, 1998, pp. 1-138.
- 18) Masubuchi Y., Kumai T., Tanaka M., Watanabe M., Akaike M., Hirai M., Abstracts of papers, the 13th Annual Meeting of the Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics., March 1993, No. 1, pp. 107-108.
- 19) Linde H. W., Berman M. L., *Anesth. Analg.*, **50**, 656-667 (1971).
- 20) Takahashi J., "Laboratory Animal Science," eds. by Ishibashi M., Takahashi J., Sugawara S., Yasuda Y., Kodansha Co., Ltd., Tokyo, 1984, pp. 215-218.
- 21) Yamaji T., *Tokyo J. Med. Sci.*, **93**, 355-361 (1986).
- 22) Hirokawa E., Kotani T., Yamate J., Kuwa-

- mura M., Sakuma S., *J. Vet. Med. Sci.*, **56**, 651–655 (1994).
- 23) Kohno M., Horio T., Yoshiyama M., Takeda T., *Hypertension*, **19**, 206–211 (1992).
- 24) Harada M., Saito Y., “Brain Natriuretic Peptide in Daily Practice,” eds. by Kinoshita M., Ogawa K., Nankodo Co., Ltd., Tokyo, 1999, pp. 1–12.
- 25) Torii R., Shimoda K., Hanada K., Takahashi K., *Exp. Anim.*, **34**, 57–62 (1985).
- 26) Maejima K., Nagase S., *Exp. Anim.*, **40**, 389–393 (1991).
- 27) Sugawara A., Nakao K., Morii N., Yamada T., Itoh H., Shiono S., Saito Y., Mukoyama M., Arai H., Nishimura K., Obata K., Yasue H., Ban T., Imura H., *J. Clin. Invest.*, **81**, 1962–1970 (1988).
- 28) Saito Y., Nakao K., Arai H., Nishimura K., Okumura K., Obata K., Takemura G., Fujiwara H., Sugawara A., Yamada T., Itoh H., Mukoyama M., Hosoda K., Kawai C., Ban T., Yasue H., Imura H., *J. Clin. Invest.*, **83**, 298–305 (1989).
- 29) Yoshimura M., Yasue H., Abstracts of papers, the 61st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, April 1997, No. 2, pp. 247–251.
- 30) Mukoyama M., Nakao K., *Rinsho Kensa*, **52**, 1308–1312 (2008).
- 31) Nishimura H., *Igaku no Ayumi*, **211**, 1107–1111 (2004).
- 32) Kuwahara M., “Doubutsu no shinden zu shinko ketsuatsu byourigaku kensa,” eds. by Sugano S., Tsubone H., Nakada Y., Adthree Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2003, pp. 129–132.
- 33) Yusa T., Katahira K., Sakoda Y., Takeishi M., Shibui H., *J. Exp. Anim. Technology*, **43**, 11–16 (2008).