



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

血清シスタチンCによる犬の腎臓病の予後予測に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-06-26 キーワード: 作成者: 岩佐, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101257

血清シスタチンCによる
犬の腎臓病の予後予測に関する研究

2022年

岐阜大学大学院
共同獣医学研究科

岩佐直樹

血清シスタチン C による
犬の腎臓病の予後予測に関する研究

岩 佐 直 樹

目次

緒言	1
第 I 章 犬の血清シスタチン C および血清クレアチニン濃度に及ぼす年齢，性別，犬種の影響	5
1. 序文	6
2. 材料および方法	7
3. 結果	10
4. 考察	19
第 II 章 健康診断で測定した犬の血清シスタチン C 濃度による腎臓病の予後予測	23
1. 序文	24
2. 材料および方法	25
3. 結果	28
4. 考察	37
第 III 章 血清シスタチン C 濃度が高値を示す無症状の犬において，モニタリング方法が予後に与える影響	41
1. 序文	42
2. 材料および方法	43
3. 結果	45
4. 考察	51
総括	54
謝辞	57

引用文献 · · · · · 58

略語

ALB: アルブミン

ALP: アルカリフォスファターゼ

ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ

AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

AUC: 曲線下面積

BUN: 血中尿素窒素

Ca: カルシウム

CKD: 慢性腎臓病

Cre: クレアチニン

CRP: C 反応性蛋白

Cys-C: シスタチン C

GFR: 糸球体濾過量

GLU: グルコース

IP: 無機リン

IRIS: International Renal Interest Society

Lip: リパーゼ

ROC: 受信者動作特性

SDMA: 対称性ジメチルアルギニン

T-Bil: 総ビリルビン

T-Chol: 総コレステロール

TG: トリグリセリド

TP: 総蛋白

UPC: 尿蛋白 / クレアチニン比

USG: 尿比重

γ -GTP: γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ

緒言

腎臓に障害が生じ、腎機能が低下した状態を腎臓病と呼ぶ。腎臓病は、病理学的には糸球体性、間質性、尿細管性および血管性などに分類され、病因的には原発性と続発性に分類される。

犬の腎機能の評価において広く認められた指標として、イヌリンまたはイオヘキソールクリアランスによる糸球体濾過量 (Glomerular filtration rate: GFR) が挙げられる [6, 12]。しかし、これらの検査は複数回の検体採取が必要であり、煩雑であることから、一般的には実施されていない。現在、犬の腎機能の評価のために、主に血中尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (Cre) が測定されている。特に血清 Cre 濃度は慢性腎臓病 (CKD) の標準的治療となる The International Renal Interest Society (IRIS; www.iris-kidney.com) のガイドラインにおけるステージ分類にも使用されている [3, 36]。しかし、血中 BUN および血清 Cre 濃度は食事、体重、犬種による筋肉量などの腎機能以外の影響が大きいことが問題である [5, 10, 18, 27]。特に血清 Cre 濃度は筋肉量に大きく依存するため、筋肉量の少ない小型犬は血清 Cre 濃度が低値になり、CKD の初期には血清 Cre が上昇しないことがある。また、血清 Cre 濃度は GFR が約 25% にまで低下しないと上昇せず、感度に問題がある [5, 13]。以上より、血清 BUN および血清 Cre 濃度では、初期の腎臓病を診断することが難しい。そのため、初期の腎臓病の検出

のために，より感度の高い腎機能の指標が必要とされてきた。

シスタチン C (Cys-C) はシステインプロテアーゼ阻害物質であり，システイン蛋白スーパーファミリーに属する 122 個のアミノ酸からなる約 13 kDa の蛋白で，全身の有核細胞から一定の割合で産生される [1, 40]。Cys-C は糸球体で濾過され，尿細管上皮細胞で約 99% 再吸収される。しかし，再吸収された Cys-C はその場で異化されるため，循環血中に戻らない。また，尿細管上皮細胞から分泌されることはない [11, 23, 40]。そのため，犬の血清 Cys-C 濃度は GFR の指標として用いられている [2, 16]。

ヒトでの研究では，血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも鋭敏に GFR の低下を反映することが報告されている [26, 34]。また血清 Cys-C 濃度は日本腎臓病学会のガイドラインにおける腎機能評価に採用されており，CKD の早期の指標 [19] および予後因子 [34, 38] としても利用されている。

腎臓病の犬においても，健康な犬と比較して Cys-C 濃度が高値を示すことが報告されている [21]。また，腎機能低下を検出するには血清 Cre 濃度よりも血清 Cys-C 濃度の方が優れているとの報告や [42]，犬の IRIS ステージ 1 の検出においては，血清 Cre や血清対称性ジメチルアルギニン (SDMA) よりも血清 Cys-C が有用であるとの報告がある [24]。このように過去の報告から，血清 Cys-C

濃度は犬における有望な腎機能に関する指標である可能性が示唆されている。しかし、犬の血清 Cys-C 濃度のこれまでの報告は、腎機能の指標である GFR との相関性 [26, 28, 29, 34] や、腎疾患に罹患した犬と健康な犬との比較検討 [21, 28] にとどまっており、腎臓病の予後を評価するために有用であるかについては不明である。また、血清 Cys-C 濃度に対する年齢などの腎機能以外の要因の影響については結論が出ていない [4, 14, 16, 31, 33]。そこで本研究では、犬の腎臓病の予後予測に関する血清 Cys-C 濃度の有用性について調べた。

まず第 I 章では、健康な犬の血清 Cys-C 濃度に対し、年齢、性別および犬種が与える影響について調べた。

第 II 章では、血清 Cys-C 濃度が腎臓病の予後予測に有用であると仮定し、健康診断において血清 Cys-C 濃度を測定した犬の腎臓病に関する予後を前向きに調べた。

第 III 章では、健康診断で血清 Cys-C 濃度が高値を示した無症状の犬を対象に、モニタリング方法による予後の違いについて回顧的に調べた。

第 I 章

犬の血清シスタチン C および
血清クレアチニン濃度に及ぼす
年齢，性別，犬種の影響

1.1.序文

血清 Cys-C 濃度は，腎機能に加えて年齢，性別および食事などの腎機能以外の要因に影響されることがヒトで報告されている [14, 25]。犬においては，179 頭の臨床的に健康な犬を用いた研究で，血漿 Cys-C 濃度は年齢による影響を受けるが，性別による影響は受けないと報告されている [4]。また Pelander らは，CKD の犬 67 頭と健康な犬 30 頭において，年齢と血清 Cys-C 濃度が相関することを報告している [33]。一方，76 頭 [28]，24 頭 [31] および 60 頭 [42] の犬を用いた研究では，年齢と性別は血中 Cys-C 濃度と相関しなかった。このように，犬の血清 Cys-C 濃度と年齢や性別との相関については結論が得られていない。また，血清 Cre 濃度は犬種によって差があることが知られているが [10]，これまでに犬種による血清 Cys-C 濃度の違いについて調べた報告はない。

本章では，年齢，性別，犬種による血清 Cys-C 濃度への影響について検証することを目的とした。これらの因子が犬の血清 Cys-C 濃度に影響を与えているならば，Cys-C 値を解釈する際にはその影響について考慮する必要がある。また，これらの因子が血清 Cre 濃度に及ぼす影響についても解析し，血清 Cys-C 濃度と比較することで，血清 Cys-C 濃度の特徴について考察した。

1.2. 材料および方法

1.2.1 対象動物

2014年1月から2020年10月の期間内に1件の動物病院で健康診断のために血清Cys-C濃度を測定した犬について、回顧的に調べた。血清Cys-C濃度は大型犬では腎機能の指標としての診断精度が劣るため[29]、体重15kg以上の犬は本研究から除外した。また飼い主からの聞き取りで何らかの臨床症状を呈する犬や、視診、聴診および触診において異常がみられた犬は除外した。参考基準値を元に、血清BUN濃度が29.2 mg/dL以上または血清Cre濃度が1.4 mg/dL以上の犬も除外した。全ての飼い主向けに動物病院内の掲示板に案内を記載し、本研究におけるデータの利用を拒否する機会を確保した。

1.2.2. データ採取

年齢、性別、体重、犬種、血清Cys-C、BUN、Cre濃度をカルテから抽出した。給餌状態に関する情報は不明であった。血液サンプルは頸静脈から採取し、採血管に入れて30分間静置し、凝固させた後に遠心機（HEMATOCRIT KH-1200、久保田商事、東京）を用いて、3,000 rpmで10分間遠心分離して血清を得た。血清サンプルは、分析が行われるまで4℃で保存した。血清Cys-C、BUN、Cre濃度の測定は、検査機関（富士フイルム VET システムズ、

東京) に依頼して実施した。血清 Cys-C 濃度は, ヒト用に開発されたラテックス免疫比濁法 (Iatro Cys-C, LSIメディエンス, 東京) を用いて測定した。血清 Cys-C 濃度の測定に関する妥当性の確認として, 富士フィルム VET システムズに依頼し, 測定内変動, 測定間変動, 希釈直線性について評価した。血清 BUN および Cre 濃度は, 自動分析装置 (JCA-BM 6070, 日本電子, 東京) を用いて, 酵素法 (L タイプワコー UN および L タイプワコー Cre-M, 富士フィルム和光純薬, 大阪) を使用して測定した。

1.2.3. 統計解析

統計解析には, R (The R Foundation for Statistical Computing, version 3.0.2) を基本としたソフトウェアである EZR [22] を用いた。コルゴモロフ・スミノフ 検定により正規性が否定されたため, 解析にはノンパラメトリック解析を使用した。血清 Cys-C または Cre 濃度と他の因子との相関はスピアマンの順位相関係数を用いて評価した。血清 Cys-C または Cre 濃度の性別間または犬種間の差は, クラスカル・ウォリス検定およびステイール・ドゥワス検定により解析した。雑種犬と個体数が 6 頭未満の犬種は「雑種・その他」に分類した。血清 Cys-C 濃度の基準範囲は, Excel (Microsoft, Redmond, USA) およびアドインソフトウェアである Reference Value Advisor V2.1 (<http://www.biostat.envt.fr/reference->

value-advisor/) を用いてノンパラメトリック法により算出した。データは中央値および範囲で記載した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意とみなした。

1.3. 結果

1.3.1. 血清 Cys-C 濃度の測定に関する妥当性の確認

血清 Cys-C 濃度の測定内変動係数は 0.23 mg/L, 0.35 mg/L, 1.01 mg/L の濃度において, それぞれ 6.3%, 2.4%, 0.9% であった。血清 Cys-C 濃度の測定間変動係数は 0.2 mg/L, 0.45 mg/L, 1.1 mg/L の濃度においてそれぞれ 2.4%, 1.9%, 1.6% であった。0.23 mg/L, 0.35 mg/L, 1.01 mg/L の検体を用いた希釈直線性試験において, 回帰直線は良好な直線性を示し, 相関係数はそれぞれ 0.997, 0.974, 0.999 であった。

1.3.2. 組み入れ症例およびデータ解析結果

本研究には当初 411 頭の犬が組み入れられた。そして問診および身体検査で異常が認められた 136 頭が除外された。さらに, 血清 BUN 濃度 29.2 mg/dL 以上または血清 Cre 濃度 1.4 mg/dL 以上を示した 25 頭を除外した。最終的に本研究には 250 頭の犬が組み入れられ, 性別および品種は表 1, 2 に示した。250 頭の犬の年齢, 体重, 血清 Cys-C, BUN 濃度, 血清 Cre 濃度を表 3 に示した。

血清 Cys-C 濃度は, 血清 Cre 濃度と正の相関がみられたが ($r_s = 0.280$, $P < 0.001$), 血清 BUN 濃度とは相関がみられなかった (図 1)。血清 Cys-C 濃度と年齢との間には正の相関がみられた ($r_s = 0.445$, $P < 0.001$) (図 2A)。

一方，血清 Cre 濃度は年齢と相関がなかった（図 2B）。血清 Cys-C 濃度は性別間で差がなかったが，未去勢雄は未避妊雌より血清 Cre 濃度が高かった（ $P < 0.05$ ）（図 3）。犬種間で血清 Cys-C 濃度に有意差はみられなかったが，血清 Cre 濃度はミニチュア・ダックスフンドとチワワで低く，柴犬で高かった（ $P < 0.001$ ）（図 4）。血清 Cys-C 濃度の基準範囲の下限および上限はそれぞれ 0.16 mg/L（90% 信頼区間 0.15～0.17）および 0.49 mg/L（90% 信頼区間 0.43～0.60）であった。血清 Cys-C 濃度は年齢との相関がみられたため，若齢（8 歳以下）および高齢（8 歳を越える）における基準範囲を算出した。8 歳以下の犬では，血清 Cys-C 濃度の基準範囲の下限は 0.15 mg/L（90% 信頼区間 0.14～0.16），上限は 0.41 mg/L（90% 信頼区間 0.38～0.60）であった。8 歳を越える犬では，血清 Cys-C 濃度の基準範囲の下限は 0.18 mg/L（90% 信頼区間 0.17～0.20），上限は 0.53 mg/L（90% 信頼区間 0.45～0.60）であった。

表 1. 試験犬の性別

性別	n
未去勢雄	71
去勢済雄	55
未避妊雌	42
避妊済雌	82

表 2. 試験犬の犬種

品種	n
ミニチュア・ダックスフンド	56
雑種	38
チワワ	30
柴	29
トイ・プードル	27
ヨークシャー・テリア	12
パピヨン	9
ポメラニアン	9
ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	7
シー・ズー	6
ミニチュア・シュナウザー	5
ビーグル	4
マルチーズ	4
シェットランド・シープドッグ	2
ミニチュア・ピンシャー	2
ジャック・ラッセル・テリア	2
ボストン・テリア	2
ウィペット	1
ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア	1
キャバリア・キング・チャールズ・スパニエ	1
ケアーン・テリア	1
ビション・フリーゼ	1
パグ	1

表 3. 試験犬の年齢，体重，血清シスタチン C 濃度，血中尿素窒素濃度，血清クレアチニン濃度

項目		中央値	範囲
年齢	(years)	9	1–19
体重	(kg)	6.1	1.3–14.9
シスタチンC	(mg/L)	0.28	0.14–0.60
尿素窒素	(mg/dL)	16.0	5.8–29.0
クレアチニン	(mg/dL)	0.8	0.3–1.4

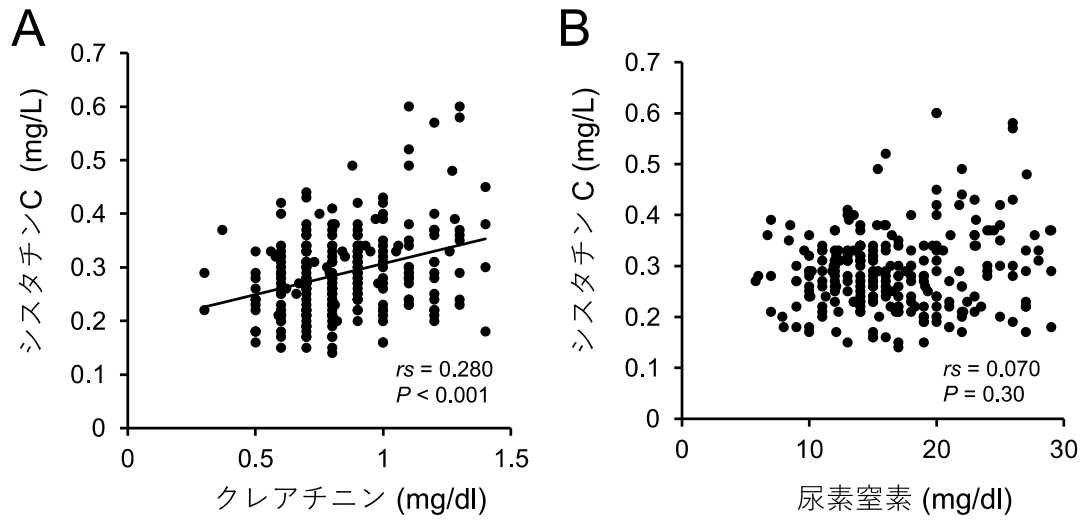


図 1. 血清シスタチン C (Cys-C) 濃度と血清クレアチニン (Cre) 濃度 (A) および血中尿素窒素 (BUN) 濃度 (B) との相関

血清 Cys-C 濃度は，血清 Cre 濃度と正の相関がみられたが，BUN 濃度との相関はみられなかった。

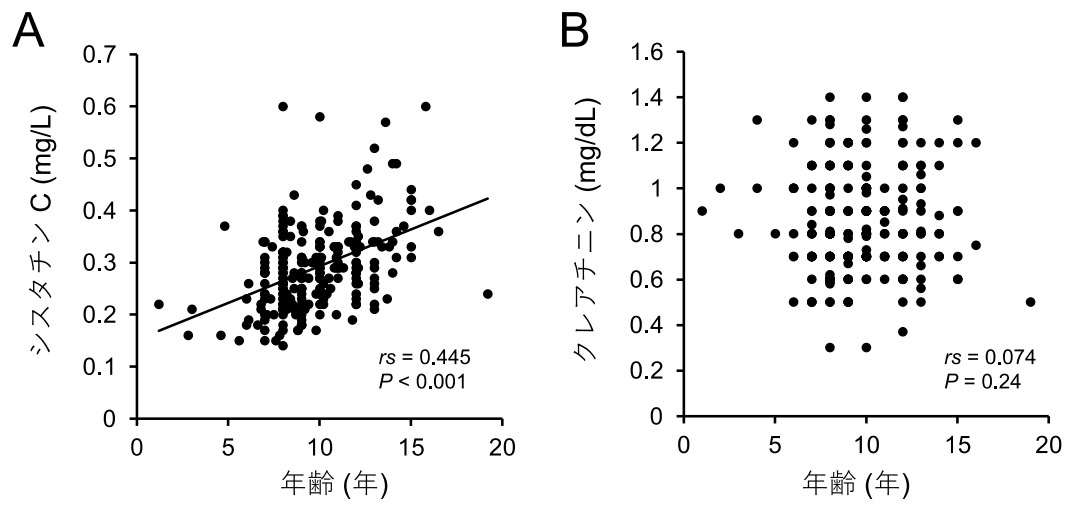


図 2. 年齢と血清シスタチン C (Cys-C) 濃度 (A) および血清クレアチニン (Cre) 濃度 (B) の相関
血清 Cys-C 濃度は年齢と正の相関がみられたが, 血清 Cre 濃度との相関はみられなかった。

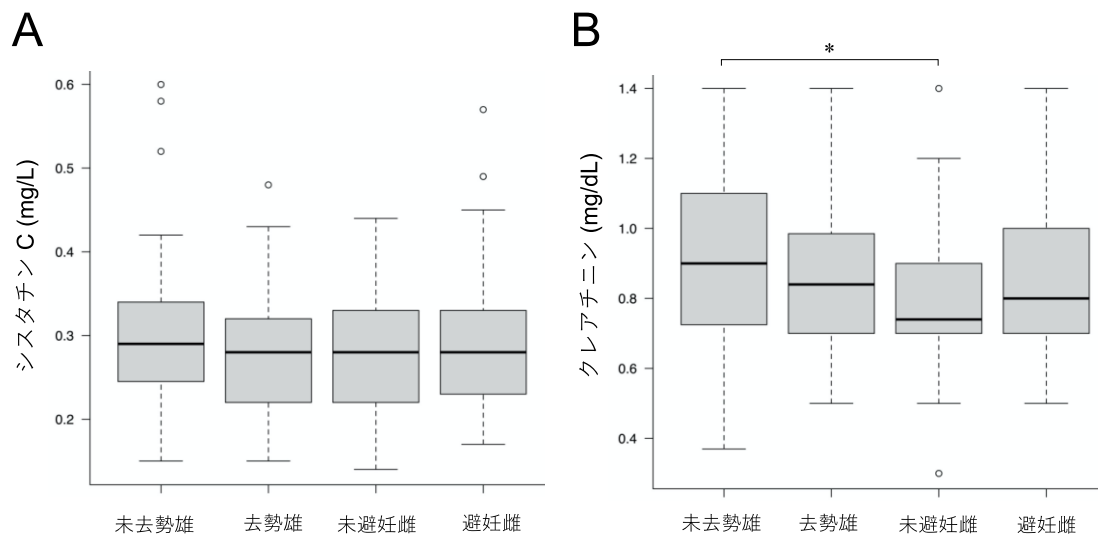


図 3. 性別による血清シスタチン C (Cys-C) 濃度および血清クレアチニン (Cre 濃度)

未去勢雄 71 頭，去勢雄 55 頭，未避妊雌 42 頭，避妊雌 82 頭における比較。血清 Cys-C 濃度は性別間で差がなかった。一方，血清 Cre 濃度は未避妊雌よりも未去勢雄において高値であった。*： $P < 0.05$

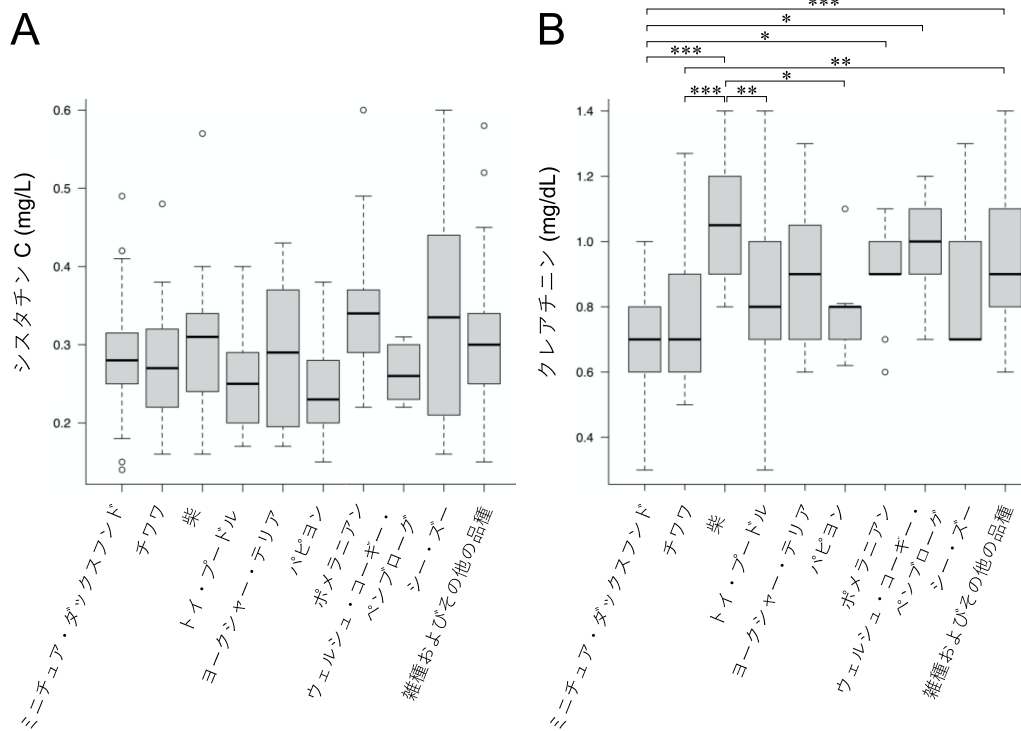


図 4. 犬種による血清シスタチン C (Cys-C) 濃度および血清クレアチニン (Cre) 濃度の差

ミニチュア・ダックスフンド 56 頭, チワワ 30 頭, 柴 29 頭, トイ・プードル 27 頭, ヨークシャー・テリア 12 頭, パピヨン 9 頭, ポメラニアン 9 頭, ウェルシュ・コーギー・ペンブローク 7 頭, シー・ズー 6 頭, 雑種およびその他の品種 65 頭における比較。血清 Cys-C 濃度に犬種間の差はなかった。一方, 血清 Cre 濃度は, 柴犬で高値であり, ミニチュア・ダックスフンドとチワワで低値であった。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

1.4. 考察

本研究では年齢と血清 Cys-C 濃度に相関が見られた。この結果は、9 歳以上の犬では血清 Cys-C 濃度が高い [4]、または血清 Cys-C 濃度が年齢と相関する [33] ことを示した過去の報告と同様であった。一方、他の報告では、犬の血清 Cys-C 濃度は年齢と関連がないと報告されている [28, 31, 42]。このように報告によって結果の相違がみられた原因は明らかでない。ヒトでは、血清 Cys-C 濃度は加齢とともに上昇することが知られている [14, 25]。ヒトの血清 Cys-C 濃度と年齢の相関は、加齢に伴う GFR の減少に起因すると考えられている [14, 15]。特に加齢による腎臓の組織構造の破壊が GFR の低下につながり、血清 Cys-C 濃度を上昇させる [9]。しかし Palender らの研究では、加齢に伴う血清 Cys-C 濃度の増加は、腎シンチグラフィにより測定した GFR とは独立していることが多変量解析から示唆された [33]。よって本研究においても腎機能低下以外の機序で血清 Cys-C 濃度が増加していた可能性が否定できない。ただし、血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも GFR の低下に敏感であることを考慮すると [29]、高齢犬における血清 Cys-C 濃度の上昇は、加齢に伴う潜在的な GFR 低下を反映しているのかもしれない。一方で、本研究において血清 Cre 濃度は年齢との相関がみられなかった。血清 Cre 濃度は 8-10 歳より高齢の犬で

減少傾向を示すことが報告されており [5], これはおそらく筋肉量の減少に起因すると考えられる。本研究では加齢により血清 Cys-C 濃度が増加傾向を示したにも関わらず, 血清 Cre 濃度が増加傾向を示さなかったのは, 加齢による筋肉量の減少によって血清 Cre 濃度が GFR を正しく反映していなかった可能性がある。

本研究では, 血清 Cys-C 濃度は性別による影響を受けなかった。ヒトにおいて, 血清 Cys-C 濃度は男性で高かったという報告もある [25]。一方で, ヒトの血清 Cys-C 濃度は性別に影響されないとする報告もある [14, 15]。この研究間での一貫性の欠落は, 人種や体型の違いに起因する可能性がある [14, 15, 17, 25]。健康な犬において, 性別は血清 Cys-C 濃度に影響しないと報告されている [4, 28, 42]。本研究の結果は, これらの過去の研究と一致し, 犬の血清 Cys-C 濃度は性別に影響されないことが確認された。一方, 血清 Cre 濃度は雄犬で高く, 過去の研究 [5, 8] の結果と一致した。雄犬において血清 Cre 濃度が高いのは, 筋肉量が多いためであると推察される [5, 8]。

上述のように, ヒトでは血清 Cys-C 濃度は人種によって差がある [17]。しかし, 本研究において血清 Cys-C 濃度に犬種間の差はなかった。体重は血清 Cys-C 濃度に影響するため [4, 28, 33], 大型犬は血清 Cys-C 濃度が高くなることが予想される。本研究では, 小型犬種のみを対象としたため, 小型犬と大型犬の比較については検討されて

いない。少なくとも，本研究で選択した小型犬種間では，血清 Cys-C 濃度に差はなかった。一方，血清 Cre 濃度には犬種間で有意差が認められた。これは，血清 Cre 濃度が筋肉量および体重と相関しているためと考えられる [5]。実際に，本研究において血清 Cre 濃度が高かった柴犬は解析した犬種の中では比較的大型であり，血清 Cre 濃度が低かったミニチュア・ダックスフンドやチワワは，比較的小型の犬種であった。その他に，グレーハウンドに見られるような犬種特異的な血中 Cre 濃度の高値である可能性も挙げることができる [10]。いずれにせよ，本研究では，血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも犬種による影響が小さいことが示された。

本研究では，健康な小型犬における血清 Cys-C 濃度の基準値を算出した。さらに，若齢および高齢における基準値を設定した。本研究で用いた犬の血清 Cys-C 濃度の平均値 (0.29 ± 0.08 mg/L) は，同じ測定法を用いた過去の研究の健常犬の値 (0.29 ± 0.08 mg/L) と全く同じであった [29]。しかし，測定法が異なれば，異なる結果が得られる可能性がある [28, 42]。したがって，本研究で設定した基準値は，同じ測定法を用いた場合にのみ利用可能である。

本研究は回顧的研究であるため，GFR を測定しておらず，また尿検査も実施していない。もし，直接測定した GFR と尿検査のデータがあれば，加齢に伴う血清 Cys-C 濃度

上昇の原因を解析することができた可能性がある。また、摂食状態やボディコンディションスコアについて評価することができなかった。犬における過去の研究では、血清 Cys-C 濃度に摂食後の変動は認められなかったが [28]、別の研究では食後に血漿 Cys-C 濃度が有意に低下した [4]。さらに、肥満は血清 Cys-C 濃度を増加させる可能性がある [40]。したがって本研究では、摂食からの時間や肥満の程度が血清 Cys-C 濃度に影響していた可能性を否定することはできない。

結論として、犬の血清 Cys-C 濃度は年齢と相関していることが明らかとなった。高齢の犬における血清 Cys-C 濃度の上昇は、加齢に伴う GFR の低下を反映している可能性があり、血清 Cre 濃度はこの潜在的な腎機能低下を反映していなかった。また血清 Cys-C 濃度は、血清 Cre 濃度と異なり、性別や犬種による影響がみられなかった。

第 II 章

健康診断で測定した
犬の血清シスタチン C 濃度による
腎臓病の予後予測

2.1.序文

血清 Cys-C 濃度は GFR の指標として知られており [2, 16], ヒトにおいて, 血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも正確に GFR の低下を反映する [26, 34]。また, 血清 Cys-C 濃度は CKD を早期発見するための指標 [19] および腎機能の予後因子 [34, 38] として用いられている。

犬における研究では, 腎不全の犬は健康な犬に比べて血清 Cys-C 濃度が有意に高値であった [21]。また, 血清 Cys-C 濃度はイオヘキソールまたはクレアチニクリアランスにより測定した GFR との相関性が高く, 血清 Cre 濃度よりも正確に CKD を診断できることから [28, 42], 血清 Cre 濃度よりも腎機能低下の検出感度に優れていると言える。このように, 犬においても血清 Cys-C 濃度は有用な腎機能の指標であることが示唆されている。しかし, 犬の血清 Cys-C 濃度に関する過去の研究はすべて回顧的横断研究であり, 血清 Cys-C 濃度を用いて予後との関連を調べた研究の報告はない。そこで, 本章では血清 Cys-C 濃度が腎臓病の予後と関連するという仮説を立て, 健康診断として測定した血清 Cys-C 濃度を用いて, 腎臓病による死亡リスクの評価が可能かどうかについて, 前向き研究を行った。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 対象動物

2013年12月から2016年3月の間に身体検査上異常が認められない犬の血清Cys-C濃度を測定した。犬の血清Cys-Cは小型犬と比べ大型犬では腎機能の指標としての診断精度が劣るため[29]、体重が15kgを超える犬は除外した。また、何らかの治療を受けている犬、嘔吐、脱水、体重減少、食欲低下、多飲多尿などの臨床症状を示した犬、聴診で心雑音を認められた犬は除外した。対象となった症例について、その後の臨床経過を追跡調査した。BUNおよびCre濃度が上昇し、腎臓病の徴候（元気消失、食欲低下、嘔吐、脱水、貧血）を伴う死亡を腎臓病関連死と定義し、エンドポイントとした。臨床経過の観察は診察時に行ったほか、一部では電話調査を行った。追跡不能例、腎臓病以外の原因で死亡した例、腎機能に影響を与える可能性がある薬物（利尿剤など）を投与した症例は、打切りとした。打切り群の生存日数は、最終来院日、死亡日、投薬開始日を元に算出した。臨床経過観察中に高窒素血症またはCKDの症状を示した犬については、IRISのCKDに関するガイドライン[3,36]に従って治療を行った。研究を目的とするサンプル採取は行わなかった。本研究におけるデータの利用を拒否する機会を提供するため、飼い主に向けて動物病院内の掲示板に案

内を開示した。

2.2.2. 測定項目

血清総蛋白 (TP), アルブミン (ALB), アルカリホスファターゼ (ALP), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), BUN, Cre, 総ビリルビン (T-bil), トリグリセリド (TG), γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GTP), 総コレステロール (T-cho1), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), グルコース (Glu), リパーゼ (Lip) および C 反応蛋白 (CRP) は自動生化学分析器 (LABOSPECT 003, 日立ハイテック, 東京) を用いて測定した。血清 Cys-C 濃度の測定は第 1 章と同様の方法であった。

2.2.3. 統計解析

測定値は中央値および範囲で表記した。統計解析には R version 3.2.1 (The R Foundation for Statistical Computing) を用いた。血清 Cys-C 濃度とその他の項目との相関関係は, スピアマンの順位相関係数を用いて解析した。腎臓病関連死群と打ち切り群における各変数の差について, マンホイットニーの U 検定を用いて解析した。血清 Cys-C 濃度, BUN 濃度, Cre 濃度による腎臓病関連死の予測のために Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を作成し, 曲線下面積 (AUC) を算出した。

その後，ROC 曲線からグラフ左上隅までの最短距離に基づいて腎臓病関連死を予測するためのカットオフ値を決定し，感度および特異度を算出した。算出した Cys-C 濃度のカットオフ値により，高 Cys-C 群および低 Cys-C 群の 2 群に分けた。各群の腎臓病特異的生存率は， Kaplan-Meier 法とログランク検定により解析した。また，質的変数はフィッシャーの正確確率検定で比較した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

2.3. 結果

2.3.1. 組み入れ症例

期間内に 352 頭の犬において血清 Cys-C 濃度の測定を行った。除外条件に該当した犬を除外した結果、140 頭が本試験に組み込まれた。性別は、雌が 73 頭、雄が 67 頭、年齢の中央値は 9 歳（範囲 7～16 歳）、体重の中央値は 6.6 kg（範囲 1.5～14.8 kg）であった。犬種は表 1 に示した。BUN 濃度、血清 Cre 濃度、血清 Cys-C 濃度および追跡期間を表 2 に示した。140 頭中 11 頭が腎臓病に関連しない原因（心不全（ $n = 2$ ）、悪性腫瘍（ $n = 6$ ）、急性膵炎（ $n = 1$ ）、神経疾患（ $n = 1$ ）、交通事故（ $n = 1$ ））により死亡した。

2.3.2. 血清 Cys-C 濃度とその他の項目の相関

血清 Cys-C 濃度とその他の項目との相関について表 3 に示した。血清 Cys-C 濃度は年齢、TP、BUN、Cre、TG、T-cho1、Ca（ $P < 0.01$ ）、ALP、Lip、CRP（ $P < 0.05$ ）と正の相関を示した。

2.3.3. 予後予測に関する解析

血清 Cys-C 濃度、BUN 濃度、血清 Cre 濃度による腎臓病関連死の予測に関する ROC 曲線を図 1 に示した。またカットオフ値、感度、特異度、AUC を表 4 に示した。血清

Cys-C 濃度の腎臓病関連死の予測に対する感度および特異度 (0.992 および 0.889) は, BUN 濃度 (0.916 および 0.889) および血清 Cre 濃度 (0.778 および 0.710) よりも高かった。また血清 Cys-C 濃度の AUC (0.970) も, BUN 濃度 (0.959) および血清 Cre 濃度 (0.782) の AUC よりも高かった。

腎臓病関連死群 (9 頭) および打切り群 (131 頭) の各項目の値について表 5 に示した。腎臓病関連死群の血清 Cys-C 濃度, BUN 濃度, 血清 Cre 濃度 ($P < 0.01$), 血清無機リン濃度 ($P < 0.05$) は打切り群に比べ有意に高値であった。

ROC 解析によって得られたカットオフ値に基づき, 高 Cys-C 群 ($> 0.55 \text{ mg/L}$) と低 Cys-C 群 ($\leq 0.55 \text{ mg/L}$) に分けて腎臓病特異的生存率を解析した(図 2)。高 Cys-C 群 ($n = 8$) (生存期間中央値は 260 日)は低 Cys-C 群 ($n = 132$) (生存期間中央値は算出不可)より腎臓病特異的生存期間が有意に短かった ($P < 0.01$)。オッズ比は 337.5 (95% 信頼区間 $28.7 \sim 1.6 \times 10^4$) であった。

表 1 . 試験犬の犬種

品種	n
ミニチュア・ダックスフンド	37
雑種	20
チワワ	15
柴	13
ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	8
トイ・プードル	7
ヨークシャー・テリア	6
ポメラニアン	6
ミニチュア・シュナウザー	6
パピヨン	5
シー・ズー	4
ビーグル	3
シェットランド・シープドッグ	2
ワイペット	1
ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア	1
キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル	1
ケアーン・テリア	1
ジャック・ラッセル・テリア	1
ミニチュア・ピンシャー	1
スピッツ	1
パグ	1

表 2. 試験犬の追跡期間，血清シスタチン C 濃度，血中尿素窒素濃度，血清クレアチニン濃度

項目		中央値	範囲
追跡期間	(日)	454	29-917
シスタチンC	(mg/L)	0.29	0.14-1.13
尿素窒素	(mg/dL)	16.0	6.0-97.0
クレアチニン	(mg/dL)	0.8	0.5-3.2

表 3. 血清シスタチン C (Cys-C) 濃度と体重, 年齢および生化学検査結果の相関

項目		n	rs	P
体重	(kg)	140	0.146	NS
年齢	(years)	140	0.408	<0.01
総蛋白	(g/dL)	140	0.321	<0.01
アルブミン	(g/dL)	140	-0.046	NS
アルカリホスファターゼ	(U/L)	140	0.207	<0.05
アラニンアミノトランスフェラーゼ	(U/L)	140	0.138	NS
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	(U/L)	140	0.043	NS
γ-グルタミルトランスフェラーゼ	(U/L)	140	-0.090	NS
尿素窒素	(mg/dL)	140	0.685	<0.01
クレアチニン	(mg/dL)	140	0.679	<0.01
総ビリルビン	(mg/dL)	140	0.064	NS
トリグリセリド	(mg/dL)	140	0.210	<0.01
総コレステロール	(mg/dL)	140	0.323	<0.01
カルシウム	(mg/dL)	140	0.287	<0.01
無機リン	(mg/dL)	140	0.208	NS
グルコース	(mg/dL)	140	0.058	NS
リパーゼ	(U/L)	140	0.167	<0.05
C反応蛋白	(mg/dL)	140	0.046	<0.05

NS: 有意差なし

表 4. 腎疾患関連死の予測に関する血清シスタチン C 濃度，血中尿素窒素濃度，血清クレアチニン濃度のカットオフ値，感度，特異度，曲線下面積

項目	カットオフ値	感度	特異度	曲線下面積
シスタチン C (mg/L)	0.55	0.992	0.889	0.970
尿素窒素 (mg/dL)	27.0	0.916	0.889	0.959
クレアチニン (mg/dL)	1.0	0.778	0.71	0.782

表 5. 打ち切り群および腎臓病関連死群における体重，
年齢および生化学検査結果

項目		打ち切り群 n = 131	腎臓病関連死群 n = 9	P
体重	(kg)	6.7 (1.5–14.8)	6.4 (2.0–11.5)	NS
年齢	(years)	9 (7–15)	10 (8–16)	NS
シスタチン C	(mg/L)	0.29 (0.14–0.58)	0.67 (0.33–1.13)	<0.01
総蛋白	(g/dL)	6.7 (5.5–8.4)	7.0 (5.8–8.4)	NS
アルブミン	(g/dL)	3.0 (1.8–3.7)	3.0 (2.0–3.3)	NS
アルカリホスファターゼ	(U/L)	165 (35–2415)	204 (105–3840)	NS
アラニンアミノトランスフェラーゼ	(U/L)	45 (17–415)	80 (19–103)	NS
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	(U/L)	29 (14–99)	32 (21–52)	NS
γ-グルタミルトランスフェラーゼ	(U/L)	7.2 (1.8–39.9)	5.6 (3.9–11.6)	NS
尿素窒素	(mg/dL)	15.0 (6.0–72.0)	52.3 (20.0–97.0)	<0.01
クレアチニン	(mg/dL)	0.29 (0.14–0.58)	1.40 (0.70–3.20)	<0.01
総ビリルビン	(mg/dL)	0.1 (0.1–0.3)	0.1 (0.1–0.3)	NS
トリグリセリド	(mg/dL)	83 (25–1000)	97 (45–330)	NS
総コレステロール	(mg/dL)	218 (89–550)	231 (142–481)	NS
カルシウム	(mg/dL)	10.3 (8.4–12.3)	10.7 (4.9–14.6)	NS
無機リン	(mg/dL)	3.6 (1.7–6.4)	4.0 (3.3–6.1)	<0.05
グルコース	(mg/dL)	90 (62–163)	88 (75–112)	NS
リパーゼ	(U/L)	77 (17–508)	98 (32–275)	NS
C反応蛋白	(mg/dL)	0.15 (0.10–6.71)	0.21 (0.15–3.53)	NS

NS: 有意差なし

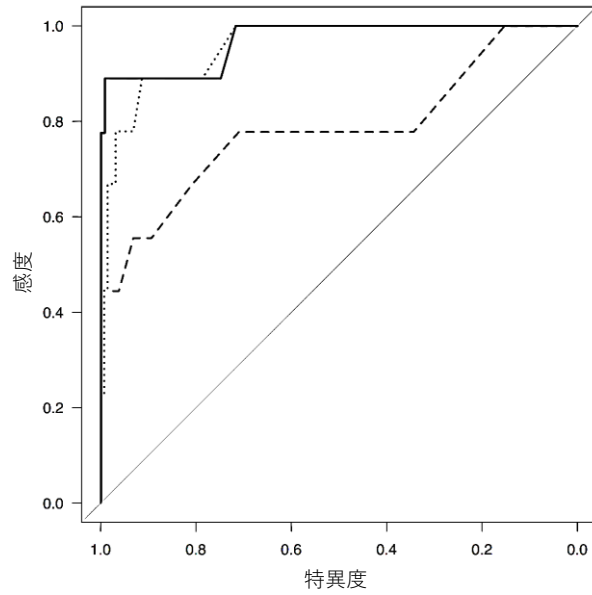


図 1. 犬の腎臓病関連死を予測に関する血清シスタチン C (Cys-C) 濃度, 血中尿素窒素 (BUN) 濃度, 血清クレアチニン (Cre) 濃度の ROC 曲線
 実線 : Cys-C, 点線 : BUN, 破線 : Cre

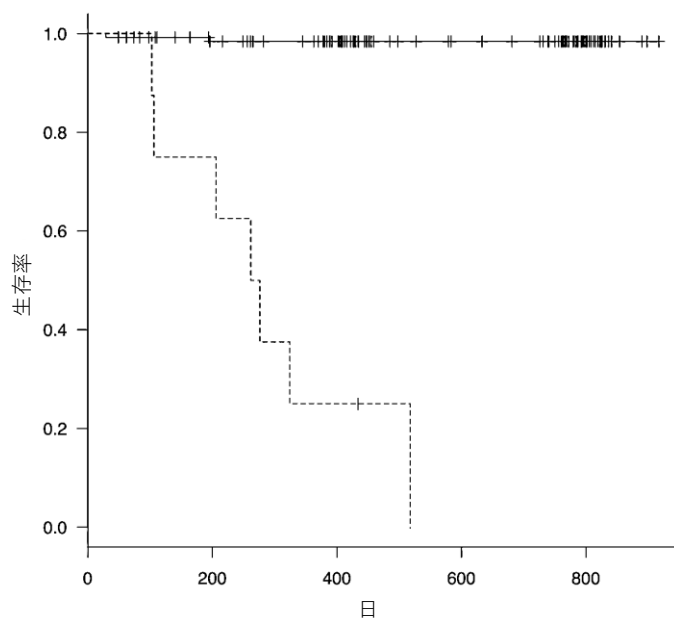


図 2. 低シスタチン C (Cys-C) 群 (≤ 0.55 mg/L) および高 Cys-C 群 (> 0.55 mg/L) における腎臓病特異的生存率に関する Kaplan-Meier 曲線

高 Cys-C 群 (8 頭) は低 Cys-C 群 (132 頭) より腎臓病特異的生存期間が有意に短かった ($P < 0.01$)。

実線 : 低 Cys-C 群 , 破線 : 高 Cys-C 群

グラフの線上の縦線は打ち切りを示す。

2.4. 考察

ROC 解析の結果，腎臓病関連死を予測する血清 Cys-C 濃度のカットオフ値を 0.55 mg/L とした。高 Cys-C 群 (> 0.55 mg/L) の犬は低 Cys-C 群 (\leq 0.55 mg/L) の犬より腎臓病特異的生存期間が有意に短いことが示された。高 Cys-C 群 8 頭のうち，7 頭が追跡期間中に死亡した。一方，低 Cys-C 群では 132 頭中 2 頭が腎臓病に関連して死亡した。この結果から，身体検査で異常を認めない犬の血清 Cys-C 濃度は，腎臓病関連死の予測に有用であることが示唆された。犬の血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも優れた GFR の指標であることが報告されているが [28]，血清 Cys-C 濃度の予後予測に関する検証はされていなかった。ヒトでは，血清 Cys-C 濃度を測定することで，CKD の早期発見と予後予測が可能と言われている [34, 38]。本研究の結果はこれらのヒトでの報告の結果と一致しており，ヒトと同様に犬の血清 Cys-C 濃度が腎臓病の予後予測の指標となる可能性が示された。

血清 Cre 濃度 [3, 28, 36] や BUN 濃度 [30] は，犬の腎機能の指標であり，小動物臨床において広く測定されている。これらの腎機能の指標の値は，腎機能に相関して増加する [3, 36, 37] ことから，本研究においても血清 Cys-C 濃度，BUN 濃度および血清 Cre 濃度の正の相関関係を認めた。これは，ヒト [11] および犬 [28] を対象としたこれまでの

研究結果と同様であった。

犬の腎臓病関連死の予測において、血清 Cys-C 濃度の ROC 曲線の AUC は血清 Cre 濃度のものよりも高かった。これは血清 Cys-C 濃度が血清 Cre 濃度よりも腎臓病に関連した死亡リスクを評価する目的において優れていることを示している。血清 Cre 濃度は、腎機能だけでなく、犬種や筋肉量などの腎臓以外の影響を受けることが知られている [10, 18, 27]。小型犬は大型犬に比べて筋肉量が少なく、血清 Cre 濃度が低値になる傾向があり [18, 27]、さらに、CKD の進行による筋肉量の減少は、GFR 低下に伴う血清 Cre 濃度の上昇を抑制する可能性がある [3]。したがって小型犬では、血清 Cre 濃度を使用し GFR を評価することが難しい場合がある [18]。犬の血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも GFR との相関性が高く [2, 28]、また第 I 章で示したように性別や犬種の影響を受けにくい。しかし血清 Cys-C 濃度も体重に影響を受け [29]、特に大型犬では腎機能を正確に反映していない可能性があるため [29]、本研究では体重 15 kg 未満の小型犬に限定して解析を行った。本研究で血清 Cys-C 濃度が血清 Cre 濃度より良好な結果を示したのは、研究対象を小型犬に限定したことが原因の 1 つであると考えられる。以上より、小型犬において腎臓病関連死を予測する場合、血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも優れていることが示唆された。

ヒトでは血清 Cys-C 濃度は心疾患の予後と関連することが知られている [43]。また犬でも心拍出量の減少による GFR の低下によって血清 Cys-C 濃度が上昇し、心疾患の重症度の報告されている [7]。よって、血清 Cys-C 濃度が腎臓病以外の原因による死亡と関連する可能性は否定できない。ただし本研究において、高 Cys-C 群で死亡した犬は全て腎臓病に関連した死亡であったため、血清 Cys-C 濃度と腎臓病以外による死亡との関連性は評価できなかった。

本研究の問題点の一つに多変量解析を行っていないことが挙げられる。本研究では、腎臓病関連死の数が少なかったため、コックス比例ハザード回帰分析などの多変量解析が不可能であり、複数の項目の影響や交絡因子、ハザード比などを評価できなかった。2 つ目の問題点として、サンプル数が少ないことが挙げられる。本研究は、身体検査で異常を認めない犬を対象とした前向き調査のため、サンプル数を増やすことが困難であった。3 つ目の問題点として尿検査や心疾患の指標の測定を実施できなかったことが挙げられる。尿検査と心疾患の指標を測定できていれば、初期の腎臓病や心疾患を検出できた可能性がある。

結論として、身体検査で異常を認めない体重 15 kg 未満の犬において、血清 Cys-C 濃度による腎臓病による死亡リスクを予測可能であることが示唆された。さらに血清

Cys-C 濃度は，小型犬では血清 Cre 濃度よりも正確な腎臓病による死亡リスクの評価が可能であることが示された。身体検査で異常を認めない小型犬の血清 Cys-C 濃度を測定することは，CKD のスクリーニングおよび予後予測のために有用であると考えられた。

第 III 章

血清シスタチン C 濃度が高値を示す
無症状の犬において，モニタリング方法が
予後に与える影響

3.1.序文

第Ⅱ章において，血清 Cys-C 濃度は，血清 Cre 濃度よりも優れた予後の指標であった。また，血清 Cys-C 濃度が高値の犬は，血清 Cys-C 濃度が低値の犬よりも腎臓病特異的生存期間が有意に短かった。この結果から，臨床症状が認められない犬においても血清 Cys-C 濃度が上昇している場合には，腎機能をモニタリングすることが重要であることが示唆された。しかし，血清 Cys-C 濃度が高くても臨床症状を示さない場合，飼い主が緊密なモニタリングを拒否することがある。そのため，緊密なモニタリングの重要性を証明できれば，飼い主の同意を得るための根拠が得られる。そこで本章では，健康診断で血清 Cys-C 濃度が高値を示した無症状の犬を対象に，その後のモニタリング方法が予後に与える影響について回顧的に調べた。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 対象動物

2013年12月から2017年4月の間に健康診断で血清Cys-C濃度を測定し、高値を示した犬について、回顧学的に研究した。第II章の結果に基づき、血清Cys-C濃度が0.55 mg/Lを超えた犬の臨床経過を調査した。犬の血清Cys-Cは小型犬と比べ大型犬では腎機能の指標としての診断精度が劣るため[29]、体重15 kg未満の小型犬のみを対象とした。多飲多尿、嘔吐、脱水、体重減少、食欲低下などの腎臓病の臨床症状を示した犬、聴診で心雑音を認めた犬は除外した。重度な腎臓病においては臨床症状の有無にかかわらず積極的な治療が必要であるため、血清Cre濃度が2.0 mg/dLを超える犬は本研究から除外した。全ての犬の飼い主に対して2~4週間毎の定期的な臨床検査によるモニタリングを提案した。提案を受け入れた飼い主の犬を臨床検査モニタリング群（CPBM群）に組み入れた。定期的な経過観察を希望しなかった飼い主の犬は、臨床症状が発現した段階で臨床検査を実施し、臨床症状モニタリング群（SBM群）に組み入れた。臨床経過観察中に高窒素血症またはCKDの症状を示した犬については、IRISのCKDに関するガイドラインに従って治療を行った。本研究におけるデータの利用を拒否する機会を提供するため、飼い主に向けて動物病院内の掲示板

に案内を記載した。

3.2.2. 測定項目

TP, ALB, ALP, ALT, AST, BUN, Cre, T-BIL, TG, GGT, T-cho1, Ca, IP, GLU, Lip および CRP は, 自動生化学分析装置 (LABOSPECT 003, 日立ハイテック, 東京) を用いて測定した。血清 Cys-C 濃度はラテックス免疫比濁法 (Iatro Cys-C, LSI メディエンス, 東京), 尿蛋白濃度は比色法 (Micro TP-AR, 富士フイルム和光純薬, 大阪), 尿中 Cre 濃度は自動分析装置 (JCA-BM2250, 日本電子, 東京) を用いた酵素法 (Lタイプワコー Cre-M, 富士フイルム和光純薬) により測定した。尿比重は, 屈折計 (MASTER-URC, アタゴ, 東京) を用いて測定した。

3.2.3. 統計解析

データは中央値および範囲で表記した。統計解析には R version 3.2.1 (The R Foundation for Statistical Computing) を用いた。群間の各項目の差は, マンホイットニーの U 検定を用いて解析した。生存率はカプランマイヤー法およびログランク検定を用いて解析した。P < 0.05 を統計学的に有意とした。

3.3. 結果

3.3.1. 組み入れ症例

期間内に 394 頭の犬の健康診断において血清 Cys-C 濃度を測定した。このうち 130 頭は何らかの臨床症状を呈したため、本研究から除外された。無症状の犬 264 頭のうち、14 頭の血清 Cys-C 濃度が高値 ($> 0.55 \text{ mg/L}$) であった。このうちの 4 頭は血清 Cre 濃度が $> 2.0 \text{ mg/dL}$ であったため研究から除外した。最終的に 10 頭が無症状かつ血清 Cys-C 濃度が高値であったため、本研究に組み入れた。定期的な来院および臨床検査によるモニタリングについて 5 頭の飼い主が受け入れたが (CPBM 群)、残りの 5 頭の飼い主は臨床症状がないことを理由に定期検査によるモニタリングを拒否した (SBM 群)。CPBM 群の性別は雌 4 頭、雄 1 頭、SBM 群の性別は雌 2 頭、雄 3 頭であった。CPBM 群および SBM 群の犬種は表 1 に示した。また、SBM 群および CPBM 群の検査結果を表 2 に示した。両群間において年齢、体重、血清 Cys-C 濃度、BUN 濃度、血清 Cre 濃度、血清 IP 濃度に有意差はなかった。SBM 群における血清 TP および ALB は、CPBM 群よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。

CPBM 群では 2~4 週間ごとに血液検査、尿検査、血圧測定を実施した。SBM 群は、飼い主が犬の臨床症状を訴えた時点で臨床検査を実施し、CKD の治療を開始した。治

療を開始したのは、CPBM群では健康診断の実施日より中央値44日（範囲11～77日）後、SBM群では中央値189日（範囲15～272日）後であった。治療開始日のSBM群およびCPBM群の検査結果を表3に示す。全ての犬において、IRISのCKDに関するガイドラインに従い、必要に応じて輸液療法、アンジオテンシン変換酵素阻害剤（ベナゼプリル塩酸塩またはエナラプリルマレイン酸塩）投与および低蛋白食の給与が行われた。

3.3.2. 予後解析

観察期間の中央値は300日（範囲106～882日）であった。観察期間中に全ての犬が腎臓病に関連して死亡した。CPBM群の生存期間（中央値441日）は、SBM群の生存期間（中央値262日）より有意に長かった（ $P < 0.05$ ）（図1）。

表 1. 試験犬の犬種

SBM 群	n	CPBM 群	n
シェットランド・シープ・ドッグ	2	ミニチュア・ダックス・フンド	2
ミニチュア・ダックス・フンド	1	ポメラニアン	1
ポメラニアン	1	シーズー	1
ヨークシャー・テリア	1	スピッツ	1

表 2. 健康診断時における臨床症状モニタリング (SBM) 群と臨床検査モニタリング (CPBM) 群の年齢, 体重および生化学検査結果

項目		SBM 群 n = 5	CPBM 群 n = 5	P
体重	(kg)	5.65 (3.54-9.05)	4.40 (4.05-13.90)	NS
年齢	(years)	15 (8-16)	14 (10-15)	NS
シスタチンC	(mg/L)	0.67 (0.59-1.09)	0.90 (0.60-0.87)	NS
総蛋白	(g/dL)	7.9 (6.8-8.4)	6.6 (6.2-7.4)	<0.05
アルブミン	(g/dL)	3.1 (2.9-3.3)	2.6 (2.4-3.0)	<0.05
アルカリホスファターゼ	(U/L)	421 (204-3840)	589 (254-1310)	NS
アラニンアミノトランスフェラーゼ	(U/L)	97 (58-103)	45 (22-157)	NS
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	(U/L)	38 (27-45)	27 (15-38)	NS
γ-グルタミルトランスフェラーゼ	(U/L)	7.2 (4.3-11.6)	8.8 (2.5-11.4)	NS
尿素窒素	(mg/dL)	39.0 (20.0-63.9)	39.8 (34.0-71.0)	NS
クレアチニン	(mg/dL)	1.4 (0.7-1.9)	1.4 (0.9-1.8)	NS
総ビリルビン	(mg/dL)	0.1 (0.1-0.1)	0.1 (0.1-0.1)	NS
トリグリセリド	(mg/dL)	89 (56-197)	150 (73-229)	NS
総コレステロール	(mg/dL)	231 (142-440)	272 (178-667)	NS
カルシウム	(mg/dL)	9.4 (4.9-11.9)	10.5 (10.2-11.3)	NS
無機リン	(mg/dL)	4.2 (3.3-5.1)	5.6 (3.5-6.2)	NS
グルコース	(mg/dL)	88 (75-111)	102 (89-110)	NS
リパーゼ	(U/L)	98 (50-173)	145 (75-397)	NS
C反応性蛋白	(mg/dL)	0.47 (0.15-1.06)	0.22 (0.15-1.6)	NS

NS: 有意差なし

表 3. 治療開始時における臨床症状モニタリング (SBM) 群および臨床検査モニタリング (CPBM) 群の生化学検査結果および収縮期血圧

項目		SBM 群 n = 5	CPBM 群 n = 5	P
シスタチンC	(mg/L)	1.19 (0.86–2.97)	0.86 (0.65–1.27)	NS
尿素窒素	(mg/dL)	129.4 (61.3–205.5)	55.1 (45–83.9)	<0.01
クレアチニン	(mg/dL)	4.9 (4.0–7.0)	1.9 (1.2–2.5)	<0.01
尿蛋白/クレアチニン比		2.2 (1.62–3.2)	1.1 (0.51–4.57)	NS
尿比重		1.010 (1.006–1.012)	1.012 (1.010–1.020)	NS
収縮期血圧	(mm Hg)	158 (137–206)	124 (117–129)	<0.01

SBM: 臨床症状モニタリング群

CPBM: 臨床検査モニタリング群

NS: 有意差なし

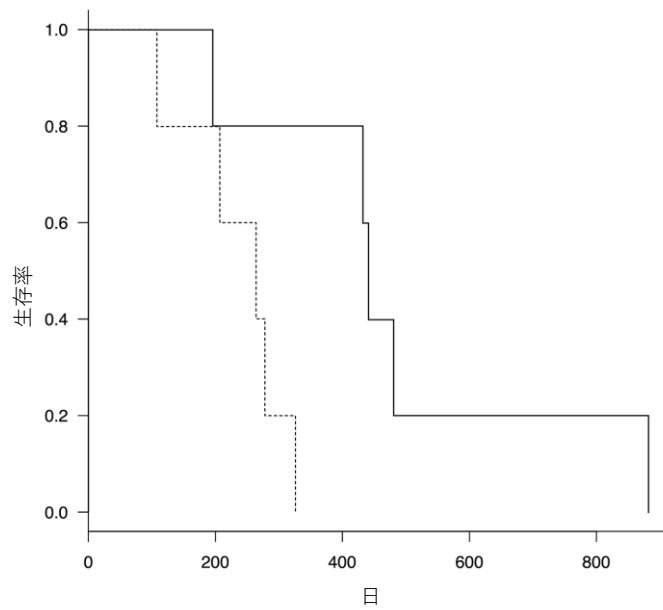


図 1. 臨床検査モニタリング (CPBM) 群および臨床症状モニタリング (SBM) 群における生存率に関する Kaplan-Meier 曲線

CPBM 群 (5 頭) の生存期間は, SBM 群 (5 頭) の生存期間より有意に長かった ($P < 0.05$)。

実線 : CPBM 群, 破線 : SBM 群

3.4. 考察

本研究において，CPBM 群の犬は SBM 群の犬よりも生存期間が長かった。ヒトでは，血清 Cys-C 濃度の高値は腎機能低下を示唆する [34, 35]。犬においても同様に血清 Cys-C 濃度の上昇は腎機能の低下を示す [28, 42]。さらに，第 II 章において血清 Cys-C 高値を示す犬は，無症状であっても腎臓病関連死のリスクが高いことがわかった。さらに，本章の結果より血清 Cys-C 濃度が高値を示す無症状の犬において，定期的な臨床検査を実施することで CKD の悪化を早期に発見できることが示唆された。早期発見により臨床症状の出現前に治療介入することで予後が改善することが示された。

血清 Cre 濃度は犬の標準的な腎機能の指標である [3, 30, 32, 36]。しかし，血清 Cre 濃度は糸球体濾過量 (GFR) が 75% 低下するまで上昇しない [5, 13]。さらに，小型犬種は筋肉量が少ないため，CKD であっても血清 Cre 濃度が上昇しにくい傾向にある [18, 27]。ヒトにおいて血清 Cys-C 濃度は，血清 Cre 濃度や推定 GFR [20, 39] よりも GFR との相関が高いことが示された [26, 34]。犬においても，血清 Cys-C 濃度は血清 Cre 濃度よりも優れた GFR の指標であることが報告されている [28, 42]。本章で用いた犬は血清 Cys-C 濃度が高値を示していたが，8 割の犬は血清 Cre 濃度が基準範囲内 (< 1.6 mg/dL) であった。

これらの犬では，血清 Cre 濃度が GFR の低下を検出できていなかったと考えられる。本章の結果より，無症状の犬において血清 Cre 濃度が基準範囲内であったとしても，血清 Cys-C 濃度が高値の場合には，2～4 週毎の臨床検査によるモニタリングが必要であることが示唆された。

本研究の問題点として，健康診断時の UPC および SDMA に関するデータがないことが挙げられる。IRIS の CKD に関するガイドラインでは，血清 Cre 濃度が低い場合であっても，UPC または血清 SDMA 濃度の上昇がみられた場合，治療が必要となる [3, 36]。これらが測定されていたならば，より早期に治療の必要性が示唆される個体が含まれていた可能性は否定できない。本研究の 2 つ目の問題点は，症例数が少ないことである。症例数が少ないため，統計解析による差の検出力が低下していた可能性がある。したがって，本研究は予備的研究として意義があると考ええる。血清 Cys-C 濃度に基づいた，検査によるモニタリングの意義についてより明確にするためには，より大規模な調査が必要である。本研究の 3 つ目の問題点は，2 群間で健康診断における血清 TP 濃度および血清 ALB 濃度に差がみられたことである。これらの高値は脱水に起因している可能性があるため，SBM 群には元々腎機能の予後を悪化させる要因があった可能性も否定できない。しかし，血清 TP 濃度と血清 ALB 濃度は両群とも基準範囲内であったため，これらの濃度の差が予後に関連する可能

性は低いと考えられた。

結論として、血清 Cys-C 濃度が高値を示す無症状の犬において、臨床検査によるモニタリングを実施することで早期治療介入が可能となり、生存期間が延長することが示された。また、血清 Cys-C 濃度が高値にも関わらず血清 Cre 濃度が基準範囲内にある犬が 8 割いたことが明らかになった。小型犬に限定した結果ではあるが、血清 Cys-C 濃度が高値であれば、症状がなく、血清 Cre 濃度が正常であっても、臨床検査による積極的なモニタリングを開始する必要があると考えられた。

総括

犬の血清 Cys-C 濃度は腎機能の指標として知られているが、犬の腎臓病の予後予測に関する意義は知られていない。また、血清 Cys-C 濃度に対する腎臓以外の要因の影響についても結論に至っていない。本研究では犬の血清 Cys-C 濃度について、腎臓病の予後予測に関する有用性について調べた。

第 I 章では年齢、性別、犬種が血清 Cys-C に及ぼす影響について調べた。血清 Cys-C 濃度は年齢との相関がみられたが、性別や犬種との相関はみられなかった。犬の血清 Cys-C 濃度は、加齢に伴う潜在的な腎機能低下を血清 Cre 濃度よりも鋭敏に検出できる可能性があること、また血清 Cre 濃度とは異なり性別や犬種に影響されないことが明らかとなった。

第 II 章では健康診断で測定した血清 Cys-C 濃度によって腎臓病による死亡リスクの評価が可能かどうかについて、前向き研究を行った。その結果、健康診断において血清 Cys-C 濃度が高値であった犬は、その後の腎臓病特異的生存期間が有意に短かった。このことから犬の健康診断における血清 Cys-C 濃度の高値により、腎臓病による死亡リスクを評価することが可能であることがわかった。

第 III 章では血清 Cys-C 濃度が高値を示す無症状の犬を対象に、その後のモニタリング方法が予後に与える影響について回顧学的に調査した。血清 Cys-C 濃度が高値を

示す無症状の犬において，臨床検査による積極的なモニタリングは早期治療介入につながり，生存期間が延長した。以上より，血清 Cys-C 濃度が高値の犬では，予後の改善のために臨床検査によるモニタリングを行うことが重要であることが示唆された。

本研究では，血清 Cys-C 濃度によって犬の腎臓病による死亡リスクを予測することが可能であることが示された。さらに，血清 Cys-C 濃度が高値を示した犬では，臨床検査によるモニタリングを行うことで予後の改善が期待できる。

謝 辞

本論文作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導をいただきました岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医内科学研究室の西飯直仁准教授に心より感謝します。

また貴重なご助言をいただきました岐阜大学の前田貞俊教授、鳥取大学の竹内崇教授に深謝いたします。

臨床研究においてご協力していただいた熊澤りえ先生、清水万夢先生、野村咲先生、岩佐達男先生、岩佐和子先生、川部美史先生、岩田宗峻先生、渡邊一弘先生、鈴木智弓先生、朝見沙羅先生、北川均先生、高島論先生、小畠結先生、羽島動物病院スタッフ一同に深く感謝申し上げます。

シスタチンCのご助言およびV & Vに貢献いただきました、どうぶつ検査センターの石井聡志様に深く感謝申し上げます。

最後に、岐阜大学の通学および博士論文作成にあたり両親および家族である岩佐真実子、岩佐直奈からの惜しめない支援に心から感謝いたします。

引用文献

- [1] Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsback M, Lundwall A, Jensson O, Grubb A. 1990. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* **268**: 287-294.
- [2] Almy FS, Christopher MM, King DP, Brown SA. 2002. Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med* **16**: 45-51.
- [3] Bartges JW. 2012. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **42**: 669-692.
- [4] Braun JP, Perxachs A, Perchereaus D, Delafarge F. 2002. Plasma Cystatin C in the Dog: Reference values and variations with renal failure. *Clin Pathol* **11**: 44-49.
- [5] Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. 2003. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol* **32**: 162-179.
- [6] Brown SA, Finco DR, Boudinot FD, Wright J, Taver SL, Cooper T .1996. Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating

- glomerular filtration rate in cats and dogs. *Am J Vet Res* **57**: 105-110.
- [7] Choi B, Moon H, Seo S, Hyun C. 2017. Evaluation of serum cystatin-C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *J Vet Med Sci* **79**: 41-46.
- [8] Connolly SL, Nelson S, Jones T, Kahn J, Constable PD. 2020. The effect of age and sex on selected hematologic and serum biochemical analytes in 4,804 elite endurance-trained sled dogs participating in the Iditarod Trail Sled Dog Race pre-race examination program. *PLoS ONE* **15**: e0237706.
- [9] Denic A, Glasscock RK, Rule AD. 2016. Structural and functional changes with aging kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* **23**: 19-28.
- [10] Feeman WE, Guilleromo Couto C, Gray TL. 2003. Serum creatinine concentrations in retired racing Greyhounds. *Vet Clin Pathol* **32**: 40-42.
- [11] Filler G, Bokenkamp A, Hofmann W, Bricon TL, Martinez-Bru C, Grubb A. 2005. Cystatin C as a marker of GFR-history, indications, and future research. *Clin Biochem* **38**: 1-8.

- [12] Finco DR, Brown SA, Crowell WA, Barsanti JA. 1991. Exogenous creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass. *Am J Vet Res* **52**: 1029-1032.
- [13] Finco DR, Brown SA, Vaden SL, Ferguson DC. 1995. Relationship between plasma creatinine and glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* **18**: 418-421.
- [14] Finney H, Newman DJ, Thakkar H, Fell JM, Price CP. 2000a. Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children. *Arch Dis Child* **82**: 71-75.
- [15] Finney H, Newman DJ, Price CP. 2000b. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* **37**: 49-59.
- [16] Ghys L, Paepe D, Smets P, Lefebvre H, Delanghe J, Daminet S. 2014. Cystatin C: a new renal marker and its potential use in small animal medicine. *J Vet Intern Med* **28**: 1152-1164.
- [17] Groesbeck D, Köttgen A, Parekh R, Selvin E, Schwartz GJ, Coresh J, Furth S. 2008. Age, gender

- and race effects on cystatin C levels in US adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**:1777-1785.
- [18] Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD, Jewell DE. 2015. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med* **29**: 808-814.
- [19] Hari P, Ramakrishnan L, Gupta R, Kumar R, Bagga A. 2014. Cystatin C-based glomerular filtration rate estimating equations in early chronic kidney disease. *Indian Pediatr* **51**: 273-277.
- [20] Inker LA, Shmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Manzi J, Lente FV, Zhang YL, Coresh J, Levey AS, CKD-EPI investigators. 2012. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med* **367**: 20-29.
- [21] Jensen AL, Bomholt M, Moe L (2001) Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-Like immunoreactivity in dogs. *Vet Clin Pathol* **30**: 86-90.
- [22] Kanda Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**: 452-458.

- [23] Kaseda R, Iino N, Hosojima M, Takeda T, Hosaka K, Kobayashi A, Yamamoto K, Suzuki A, Kasai A, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A. 2007. Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 1130-1134.
- [24] Kim J, Lee CM, Kim HJ. 2020. Biomarkers for chronic kidney disease in dogs: a comparison study. *J Vet Med Sci* **82**: 1130-1137.
- [25] Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, Hillege HL, de Zeeuw D, Curhan GC, de Jong PE. 2004. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* **65**: 1416-1421.
- [26] Laterza OF, Price CP, Scott MG. 2002. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* **48**: 699-707.
- [27] Médaille C, Trumel C, Concordet D, Vergez F, Braun JP. 2004. Comparison of plasma/serum urea and creatinine concentrations in the dog: a 5-year retrospective study in a commercial veterinary clinical pathology laboratory. *J Vet Intern Med* **51**: 119-123.
- [28] Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H. 2009. Evaluation of the measurement of serum cystatin C

by an enzyme-linked immunosorbent assay for humans as a marker of the glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Med Sci* **71**: 1169-1176.

[29] Miyagawa Y, Akanabe R, Ogawa M, Nagkawa M, Miyakawa H, Takemura N. 2021. Serum cystatin C concentration can be used to evaluate glomerular filtration rate in small dogs. *J Vet Med Sci* **82**: 1828-1834.

[30] O' Neill DG, Elliott J, Church DB, McGreevy PD, Thomson CC, Brodbelt DC. 2013. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: prevalence, risk factors, and survival. *J Vet Intern Med* **27**: 814-821.

[31] Pagitz M, Frommlet F, Schwendenwein I. 2007. Evaluation of biological variance of cystatin c in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *J Vet Intern Med* **21**: 936-942.

[32] Parker VP, Freeman LM. 2011. Association between body condition and survival in dogs with acquired chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* **25**: 1306-1311.

[33] Pelander L, Haggstrom J, Larsson A, Syme H, Elliott J, Heiene R, Ljungvall I. 2019. Comparison

- of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med* **33**: 630-639.
- [34] Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman S, McClellan W, Zakai NA, Safford MM, Zhang X, Muntner P, Warnock D. 2011. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine Albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA* **305**: 1545-1552.
- [35] Prause LC, Grauer GF. 1998. Association of gastrointestinal haemorrhage with increased blood urea nitrogen and BUN/creatinine ratio in dogs: a literature review and retro-spective study. *Vet Clin Pathol* **27**: 107-111.
- [36] Polzin DJ. 2011. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **41**: 15-30.
- [37] Polzin DJ. 2013. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care* **23**: 205-215.
- [38] Shlipak MG, Matsushita K, Arnlov J, Inker LA, Phil RD, Polkinghorne KR, Epi MC, Rothenbacher D,

- Sarnak M, Astor B, Coresh J, Levey A, Gansevoort R. 2013. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med* **369**: 932-943.
- [39] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, Feldman HI, Froissart M, Kusek J, Rossert J, Lente FV, Bruce RD, Zhang Y, Greene T, Levey AS. 2008. Estimating GFR using serum Cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3418 individuals with CKD. *Am J Kidney Dis* **51**: 395-406.
- [40] Tenstad O, Roald AB, Grubb A, Aukland K. 1996. Renal handling of radio-labelled human cystatin C in the rat. *Scand J Clin Lab Invest* **56**: 409-414.
- [41] Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Holden SL, Biourge V, Morris PJ, German AJ. 2013. Effect of weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease. *J Vet Intern Med* **27**: 31-38.
- [42] Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. 2008. Utility of serum cystatin c as a clinical measure of renal function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* **44**: 131-138.
- [43] Wu C, Lin J, Caffrey JL, Chang M, Hwang J, Lin Y. 2010. Cystatin C and long-term mortality among subjects with normal creatinine-based estimated

glomerular filtration rates. *J Am Coll Cardiol* **56**:
1930-1936.