

ウシでの腎糸球体濾過量（GFR）に関する基礎的研究

2013 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

村山 勇雄

目 次

Abbreviation

緒論	1
第 1 章 ホルスタイン種乳牛における腎糸球体濾過量 (GFR) の測定	7
1. 小序	7
2. 材料および方法	9
2-1 使用薬物	
2-2 使用動物	
2-3 全身クリアランス法 (頻回採血法) による GFR の測定	
2-3-1 Iodixanol の投与量の設定	
2-3-2 Iodixanol の血清消失推移	
2-3-3 Inulin の血清消失推移	
2-3-4 Iodixanol と inulin の同時投与での GFR の相関性	
2-3-5 GFR に対する体重, 年齢, 産次および泌乳の影響	
2-3-6 血清 iodixanol 濃度の測定と血清化学検査	
2-3-7 GFR の算出	
2-4 1 回採血法による GFR の測定	
2-5 統計処理	
3. 結果	14
3-1 Iodixanol の投与量の設定	
3-2 Iodixanol の血清消失推移と採血時間の設定	

3-3	Inulin の血清消失推移	
3-4	Iodixanol と inulin の同時投与における GFR の相関性	
3-5	GFR に対する体重, 年齢, 産次および泌乳の影響	
3-6	1 回採血法と頻回採血法における GFR の相関性	
4.	考察	17
5.	小括	20
	Table	21
	Figure	23
第 2 章	黒毛和種肉用牛における腎糸球体濾過量 (GFR) の測定	27
1.	小序	27
2.	材料および方法	28
2-1	使用薬物	
2-2	使用動物	
2-3	全身クリアランス法 (頻回採血法) による GFR の測定	
2-3-1	Iodixanol または inulin の血清消失推移	
2-3-2	Iodixanol と inulin の同時投与における GFR の相関性	
2-3-3	GFR に対する体重, 年齢および産次の影響	
2-3-4	腎機能低下牛における GFR	
2-3-5	血清 iodixanol 濃度の測定と血清化学検査	
2-3-6	GFR の算出	
2-4	ホルスタイン種 1 回採血式による GFR の算出	
2-5	統計処理	
3.	結果	30
3-1	Iodixanol または inulin の血清濃度消失曲線	

3-2	Iodixanol と inulin の同時投与における GFR の相関性	
3-3	GFR に対する体重, 年齢および産次の影響	
3-4	腎機能低下牛における GFR	
3-5	頻回採血法とホルスタイン種 1 回採血式における GFR の相関性	
4.	考察	32
5.	小括	34
	Table	35
	Figure	36

第 3 章 統合式を用いた乳牛および肉用牛の腎糸球体濾過量 (GFR) の測定

		40
1.	小序	40
2.	材料および方法	41
2-1	使用薬物	
2-2	使用動物	
2-3	血清 iodixanol 濃度の測定と血清化学検査	
2-4	GFR の測定	
2-4-1	頻回採血法による GFR の算出	
2-4-2	ホルスタイン種 1 回採血式による GFR の算出	
2-4-3	統合式による GFR の算出	
2-4-4	統合式と頻回採血法における GFR の相関性	
2-4-5	頻回採血法, ホルスタイン種 1 回採血法および統合式における GFR と品種差	
2-4-6	統合式による GFR と BUN あるいは血清 creatinine 濃度の相関性	
2-5	統計処理	

3. 結果	43
3-1 統合式による estimated Vd の算出	
3-2 統合式と頻回採血法における GFR の相関性	
3-3 頻回採血法, ホルスタイン種 1 回採血法および統合式における GFR と 品種差	
3-4 統合式による GFR と BUN あるいは血清 creatinine 濃度の相関性	
4. 考察	45
5. 小括	47
Table	48
Figure	49
総括	51
謝辞	54
引用文献	55

Abbreviation

ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収, 分布, 代謝, 排泄
AUC	area under the curve	曲線下面積
BSA	body surface area	体表面積
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
C	serum concentration	血清中薬物濃度
C_0	proposed serum concentration at 0 min in an x axis	初期血清中濃度
Cl	systemic clearance	全身クリアランス
C_t	serum concentration at time “t”	“t” 時間における血清濃度
CV	coefficient of variation	変動係数
Dose	dose level	投与量
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エデト酸
<i>eq.</i>	Equation	式
Estimated Vd	estimated volume of distribution	算出した分布容積
GFR	glomerular filtration rate	糸球体濾過量
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
T	sampling time	採血時間
Vd	volume of distribution	分布容積

緒 論

ウシの腎臓は腰椎の腹側に沿い対側的に位置し、右腎は第 12 肋骨～第 2・3 腰椎間に、左腎は第 2～5 腰椎間に存在している。したがって、左腎は右腎よりもやや後方にあり、第一胃腎間膜で連結し第一胃の容積によって容易に位置を変えるので、特に遊走腎と呼ばれている。肉眼的には、長楕円形で表面に多数の溝を認め、腎実質は約 20 個の腎葉に分かれている。各腎葉は皮質の表層と髄質の内帯が分離しているだけで、皮質の深層や髄質の外帯は隣接の腎葉の同部位と癒合する不完全分葉腎（多葉腎）であり、複数個の腎葉に対し 1 つの腎乳頭を形成している。ウシでは腎盤（腎盂）は認められず、代わりに尿管の最終終末分枝が腎杯を形成し、その中に各腎葉に続く腎乳頭が入り込んでいる。各腎杯は太い 2 本の主な導管に合流し、さらにこの 2 本の導管が腎臓の両極から集まり合流し、1 本の尿管が作られている [34]。

腎臓の脈管系は、腹大動脈から腎門付近で左右の腎臓に分岐し、各々の腎動脈から実質中に入り、葉間動脈に分枝して腎皮質へ向かい弓状動脈となる。弓状動脈は小葉間動脈に分枝し、周囲の腎小体（マルピギー小体）に対して輸入細動脈を投射し、糸球体を形成して、輸出細動脈として糸球体から出ている。その後、再び毛細血管になり、尿細管に絡みつきながら、再吸収された原尿成分を運搬するとともに腎実質に栄養および酸素の供給を行っている。糸球体に血液が流入すると血液成分が糸球体の内皮細胞、基底膜、上皮細胞や糸球体を直接包むボーマン囊の内葉がフィルターとして働き濾過される。この時、赤血球、白血球、血小板や血漿タンパク質のような高分子（68,000 以上）は通過されない。濾過された原尿は、尿細管でその大部分が再吸収され、循環血液に戻る。さらに、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 CO_2 、アミノ酸やブドウ糖も近位あるいは遠位尿細管で能動的に再吸収されている [26]。

腎臓は、ネフロン（腎単位）で構成され、腎小体、近位尿細管、ヘンレーループ（係蹄）、遠位尿細管、接合管および集合管より成っている。生理学的には、酸塩基平衡、物質の代謝、電解質の調節、体液量の調節、老廃物の排泄、ビタミン D₃ の活性化、プロスタグランジンの生成、レニンおよびエリスロポイエチンの分泌など生体では極めて重要な役割を担っている [51]。ウシでは、ネフロンは 1 側当たり 400 万個存在し、成牛では約 83,000 L/日の血液が糸球体に流入し、約 1,300 L/日が濾過され、再吸収を経て約 6-12 L/日の尿が生成されている [10]。

ウシの腎機能検査としては、新鮮尿を用いて、pH、タンパク質、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲンおよび潜血の定性試験が試験紙により定型的に行われている。しかし、これらの検査は、飲水量や尿量に左右され易く、検査までの時間、日内変動、個体差や環境因子の影響も大きいため、腎臓の障害度やその重篤度を示す腎残存予備能を正確に把握することは難しい。血液生化学検査としては、血中尿素窒素（blood urea nitrogen, BUN）と creatinine 濃度の測定が通常行われているが、BUN は食餌（摂餌からの時間、粗・濃厚飼料の品質、成分あるいは給与量、TMR（total mixed ration, 給与や分離給与）に影響され易く、creatinine は筋肉の代謝産物に由来し、糸球体濾過量（glomerular filtration rate, GFR）が 60-70% 程度低下して初めて上昇を示す反応性の低さが指摘されている [29, 37]。その他、尿中に含まれるアルブミン量の定量、リソゾーム由来酵素 N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAG）、腎細胞質由来乳酸脱水素酵素（LDH）、腎近位尿細管細胞刷子縁由来アルカリフォスファターゼ（ALP）あるいは γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）、低分子タンパク質である β₂-ミクログロブリン（分子量 10,000 前後）やシスタチン C（分子量 20,000 前後）の測定が一部行われているが、採尿や測定操作の煩雑さ、尿中の種々の活性因子あるいは阻害因子の影響により、ウシでは、その臨床学的意義は確定していない。さらに、直腸より左腎の触診（不

完全分葉腎，遺伝性腎低形成症)，膀胱内の尿貯留，尿沈渣の細菌培養あるいは理化学的性状検査が，一部補助診断として行われているが障害度や腎残存予備能を正確に予測できない [44]。このように，ウシでは腎臓の残存予備能の程度や予後判定についてほとんど報告がなく [47]，手つかずの状況にある。

一方，ヒトでは，腎 GFR の測定は，腎臓病診断の “gold standard” と云われている [19]。すなわち，GFR は腎障害の初期から鋭敏に反応し，新規腎バイオマーカーの評価に対し，基準指標と位置づけられている。GFR の測定は，標準的に生体内で代謝を受けず，糸球体のみで濾過され，尿細管からの再吸収や分泌のない tracer を単回静脈内負荷し，一定時間後に複数回採血を行い，血漿（清）tracer 濃度がプラトーな状態になった時点における尿中総 tracer 排泄量（正確な尿量と濃度測定）を算出し，尿中へのクリアランスを調べる手法である [49]。GFR 用 tracer としては，多糖類由来の inulin (Fig. 1A) が国際的に認知されているが，本剤は溶解度が極めて低く，低温環境下では析出し易く専用の加温器が必要で，投与量も多く，かつ比色法のために測定感度が低く，獣医療への適用は難しいとされている。このため，伴侶動物臨床分野では代替 tracer として，creatinine [11, 39]，チオ硫酸ナトリウム [13, 43] あるいは非イオン性ヨード系 1 量体 X 線造影剤 iohexol (Fig. 1B) [6, 41, 42] が取り上げられてきた。しかし，creatinine は尿細管から 5% 程度分泌されるためクリアランス値が高値 [3, 8] を示すことがあり，チオ硫酸ナトリウムは投与液量 (4 - 5 mL/kg) が極めて多いことから，ウシ獣医療ではほとんど応用されていない。一方，iohexol は，浸透圧（浸透圧比：約 2）が高く，局所刺激性を起こす難点がある。

そこで，著者はウシにおける GFR 測定に際し，tracer として非イオン性ヨード系等張 2 量体 X 線造影剤である iodixanol (Fig. 1C) に着目した。Iodixanol は，

iohexol 同様の物理化学的特性を有するが、等張性で投与時の疼痛や熱感がほとんど認められない [32, 33, 50]。また、ヒトの慢性腎臓病患者を用いての 2 重盲検試験では、iohexol に対し血清 creatinine 濃度を有意に上昇させないという evidence-based medicine (EBM) が立証され [2, 27, 35] 医療現場で広く応用されている。さらに、iodixanol は 1 分子中に 6 つのヨード (Fig. 1C) を有するため、1 分子中に 3 つのヨードを有する iohexol (Fig. 1B) に比べ、半量で iohexol と同様の薬理 (造影) 効果を発揮することも確認されている [32, 33]。

本研究では、ウシにおいて 1 回採血法による GFR 測定方法の確立を目的として、まず関与する諸因子の影響を基礎的に検討するとともに、臨床現場での応用の可能性について、以下の 3 章にわたり検討した。

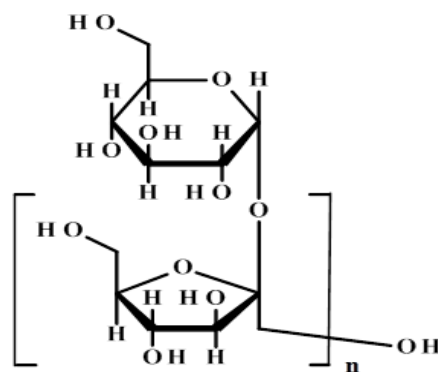
第 1 章では、健康ホルスタイン種乳牛を用いて、iodixanol および inulin の投与量と採血時間を設定した。その後、両剤を同一牛に同時投与し、全身クリアランス (頻回採血) 法で GFR 値を求め、得られた値の同等性を調べた。次いで、GFR 値に及ぼす体重、加齢、産次数および泌乳量の影響を調べた。さらに、健康牛と腎機能低下牛 (臨床症例) を用いて、頻回採血法での GFR 値、採血時間、分布容積および血清 iodixanol 濃度と Jacobsson の 1 回採血法の式 [23] を併用して、iodixanol 単回静注・1 回採血法で GFR を求める新たな式の確立を試みた。

第 2 章では、黒毛和種肉用牛を用いて、第 1 章の結果を基に、iodixanol と inulin を同一牛に同時投与し、頻回採血法で GFR 値を求め、同等性を確認した。その後、GFR 値に及ぼす体重、加齢および産次数の影響を調べた。次に、健康牛と腎機能低下牛 (臨床症例) を用いて、頻回採血法で求めた GFR 値と第 1 章においてホルスタイン種乳牛で確立した 1 回採血式 (以下、ホルスタイン種 1 回採血式) を用いて得られた GFR 値を比較し、ホルスタイン種 1 回採血式が黒毛和種肉用牛にも共通して適用できるか調べた。

第3章では、第1および第2章で得られた全データを用いて、ホルスタイン種および黒毛和種の両種に共通して使用出来る1回採血式（統合式）の確立を試みた。すなわち、新たに作成した統合式より求めたGFR値と第1章および第2章での頻回採血法とホルスタイン種1回採血式で得られた各GFR値を比較し、同一性を調べ、統合式が両種に共通して適用可能か検討した。また、得られた成績から、Jacobssonの式の普遍性を証明できるかどうか検討した。

以上、本研究では、ウシのGFR測定を簡便なiodixanolの単回静注・1回採血法で代替できるという仮説を証明することを試みた。

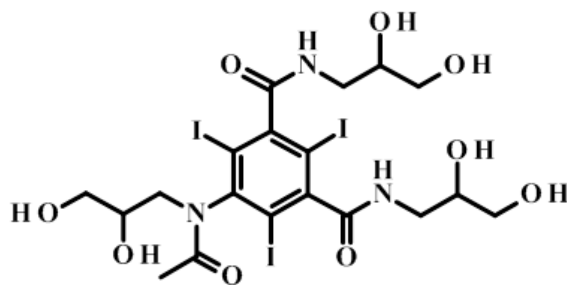
A. Inulin



Molecular formula : $C_6H_{11}O_5(C_6H_{10}O_5)_nOH$

Molecular weight : 3,000-8,000

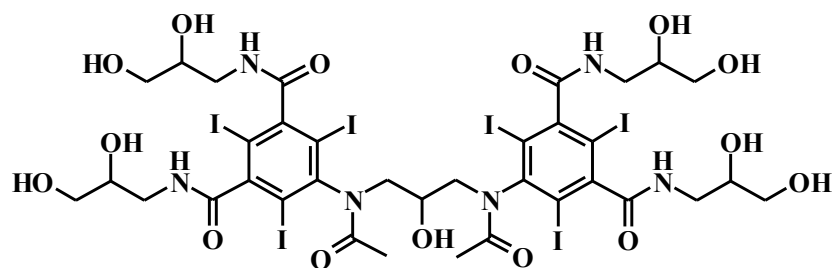
B. Iohexol



Molecular formula : $C_{19}H_{26}I_2N_3O_9$

Molecular weight : 821

C. Iodixanol



Molecular formula : $C_{35}H_{44}I_2N_6O_{15}$

Molecular weight : 1550

Fig. 1 Chemical structure of inulin, iohexol and iodixanol

第 1 章 ホルスタイン種乳牛における腎糸球体濾過量 (GFR) の測定

1. 小序

ネコ [39] やイヌ [53] のような小動物あるいはヒト [19] の腎機能を把握する上で、GFR は極めて重要な指標であるが、ウシ獣医療ではほとんど顧みられていない。その理由として、標準的な尿クリアランス法は、tracer である inulin の極めて難溶であるという物性、正確な頻回尿採取の困難さや測定操作の煩雑さ、あるいは残留性や乳汁移行性の不明瞭さも応用を躊躇させる要因である。したがって、ウシでの GFR 測定は、実験・研究目的に限られ、これまで inulin クリアランス [1] , チオ硫酸ナトリウム血漿半減期 [47] , 内因性 creatinine クリアランス [45] あるいは放射性同位元素 $^{51}\text{Cr-EDTA}$ のクリアランス [54] が報告されているに過ぎない。

最近、小動物臨床領域では、GFR 測定の tracer として、非イオン性 1 量体ヨード系造影剤 iohexol (Fig. 1B) が用いられている [6, 42] 。本剤は、生体内で代謝を受けず、血漿蛋白質との結合や腎尿細管からの分泌・再吸収もなく、糸球体濾過でのみ尿中に排泄されるという inulin と類似した物理化学的性状と体内挙動を有する。反面、浸透圧の高さから投与時の疼痛や、特にネコでは腎機能の悪化 [38, 40] が危惧されている。

これらの問題点を解消するために、ウシでの GFR 測定の際に新規 tracer として、非イオン性等張 2 量体ヨード系造影剤 iodixanol (Fig. 1C) に着目した。ラベル体 iodixanol を用いた ADME 実験 [16] では、低用量 (200 mg I/kg) の静脈内単回投与で、そのほとんどが尿中に未変化体として排泄され (サル: 95% 以上)、糞中排泄 (ラット: 0.9% 以下) やラット、サルおよびヒトの動物種差もほとんどないことが報告されている。また、水溶性等張であるために局所刺激性や腎機能の悪化も少ないことが確認されている [2, 27, 35] 。このように、安全性が確認され

ているが、現在、子牛のみ報告 [20] があるだけで成牛への応用は報告されていない。

本研究では、GFR の算出に関しては、尿採取の必要のない全身クリアランス法 (CI) を採用した。すなわち、糸球体濾過のみで尿中に特異的に排泄される tracer の CI 値は、GFR 値と等しくなるという薬物動態学的根拠に基づき、tracer の血清濃度・時間曲線より曲線下面積 (AUC) を求め、tracer の投与量をその AUC で除すことで CI 値 (= 投与量/AUC) を算出した。

本章では、ホルスタイン種乳牛での GFR 測定法の確立を目的として、まず健康牛を用いて、iodixanol の投与量を設定し、その後、血清消失挙動を詳細に調べ、採血時間を確定した。次に、inulin との同等性を確認するために、iodixanol と inulin を同一動物に同時投与し、各 GFR 値を求め、得られた値を比較した。さらに、GFR の生理学的変動を調べるために、iodixanol による頻回採血法において健康牛の GFR 値に及ぼす体重、加齢、産次数および泌乳量の影響を調べた。その後、頻回採血法では、牛体への負担が大きく、臨床応用が困難と考えられたため、健康および臨床症例 (腎機能低下牛) のデータをもとに、1 回採血法での新規 GFR 算出式の作出を試みた。

ヒトでは、血清 creatinine 濃度から、予測式を用いて GFR が算出されているが、ウシにおいては、血清 creatinine 濃度の測定法が標準化されておらず、背景値あるいは変動因子の影響も不明なため、ヒト用既知予測式は応用できない。そこで、Jacobsson の 1 回採血法の式 [23] に注目した。本式には、1-コンパートメントモデルをもとに変動係数として、投与量 (Dose)、採血時間 (t)、血清濃度 (Ct) および 分布容積 (Vd) が含まれている。既報告 [7, 15] によると、本式で得られた GFR 値は、標準尿 inulin クリアランス法での値と極めて高い相関性のあることが確認されている。Jacobsson の式の応用に際しては、健康牛と腎機能低下牛 (臨床症例) の GFR 値を頻回採血法で求め、iodixanol の投与量、採血時間 (t: 60, 90 お

よび 120 分) とその時間の血清 iodixanol 濃度 (Ct) を式に代入し, これを Newton 法で解き, 各分布容積 (Vd) を求めた。その後, Vd と C との関係式を scatter plot で解析し, 相関性の最も高い時間帯を 1 回採血法の採血時間として採用した。実際の GFR の測定では, Vd 値は iodixanol の濃度 (Ct 値) より求め, これを Jacobsson の式に再度代入することで算出した。このような, 複雑な過程を踏襲した理由として, 1-コンパートメントモデルの初期血清中濃度 (C₀ 値) から求めた Vd 値 (Vd = Dose/C₀) は, 採血時間が 3 - 4 ポイントのため変動幅が大きかったことが挙げられる。

2. 材料および方法

2-1 使用薬物

GFR 測定用 tracer として, iodixanol (ビジパーク 320®; 320 mg I/mL, 290 mOsm/kg H₂O, 第一三共, 東京) と inulin (イヌリド®; 100 mg/mL, 富士薬品, 埼玉) を用いた。なお, iodixanol はヨウ素を含有することから, 単位は, “mg I あるいは μg I” で表した。

2-2 使用動物

伊具地区 (宮城), 小岩井地区 (雫石, 岩手) および岩手大学農学部附属動物病院 (盛岡) で繋飼いにより飼育されている健康なホルスタイン・フリージアン (ホルスタイン) 種の非泌乳 (育成と乾乳) 牛と泌乳牛を 109 頭用いた。頭数, 体重, 年齢および血清 BUN と creatinine 濃度範囲は, (Table 1) に示した。使用した牛は全飼料中約 50 % の濃厚飼料とともに, イタリアンライグラス, オーツヘイまたはチモシーを乾草またはサイレージとして飼槽で飽食給与され, 自由に飲水させた。なお, 用いた動物は一般診察, 血液検査 (BUN: 20 mg/dL 以下, creatinine: 1.2 mg/dL 以下) あるいは尿検査により, 健康であることを確認した。

腎機能低下牛は、血清 BUN (30 mg/dL 以上) と creatinine 値 (1.2 mg/dL 以上) が、共に上昇した個体と定義したが、その原因の詳細は不明であった。なお、腎機能低下牛では血清 iodixanol の血中消失速度のデータが十分でないため、本実験では BUN が 60 mg/dL 以上、あるいは血清 creatinine が 6 mg/dL 以上の症例は除外した (Table 2)。この理由として、iodixanol を用いた実験的腎機能低下子牛での GFR 測定の報告 [20] によると、定義した血清 BUN あるいは creatinin 値レベルでは、血清 iodixanol 濃度は投与 24 時間後には消失することを確認しているため、このような条件を加えた。

牛の取り扱いは、全て日本実験動物学会のガイドライン [24] に準拠し、岩手大学実験動物委員会で承認 (A201027) されている。

2-3 全身クリアランス法 (頻回採血法) による GFR の測定

2-3-1 Iodixanol の投与量の測定

非泌乳非妊娠牛 (体重 270 - 700 kg, 1 - 3 歳, n = 3) を用いた。Iodixanol の用量は、子牛での既報告 [21] を基に、5, 10 および 20 mg I/kg とし、頸静脈に留置したカニューレ (UK-カテーテルキット, 14G, ユニチカ, 愛知) より単回 bolus 静脈内投与した。採血は、カニューレを介して投与前と排泄相 (excretion phase) である投与 60, 90, 120 および 150 分後の計 5 回、対側頸静脈より行った (1 mL/回)。各試験は、3 × 3 のクロスオーバー (Latin Square Design) で実施し、少なくとも 5 日間以上空けて行った。

2-3-2 Iodixanol の血清消失推移と採血時間の設定

非泌乳非妊娠牛 (体重 270 - 700 kg, 1 - 3 歳, n = 6) を用いた。Iodixanol の用量は、10 mg I/kg (投与量 : 0.031 mL/kg) とし、採血時間は、投与前と投与後 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 および 180 分後の計 10 回とした (1 mL/回)。得られたデー

タを基に、1-コンパートメントモデルと2-コンパートメントモデルにより AUC を算出し [12] , 各 GFR 値 (“2-3-7” 参照) を求め比較した。さらに、採血時間を設定するために、下記の排泄相の採血時間の組合せで、1-コンパートメントモデルより AUC を求め、GFR 値を比較した。

- a) 投与 60, 90, 120 および 150 分
- b) 投与 60, 90 および 120 分
- c) 投与 60, 90 および 150 分
- d) 投与 60, 120 および 150 分
- e) 投与 90, 120 および 150 分

2-3-3 Inulin の血清消失推移

非泌乳非妊娠牛（体重 270 - 700 kg, 1 - 3 歳, n = 3）を用いた。Inulin の用量は既報告 [21] を基に、30 mg/kg（投与液量：0.3 mL/kg）の1用量とした。採血は投与前および投与後 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 および 180 分後に計 10 回行った（1 mL/回）。

2-3-4 Iodixanol と inulin の同時投与での GFR の相関性

非泌乳非妊娠牛（体重 500 - 800 kg, 2 - 4 歳, n = 14）と腎機能低下牛（500 kg, 1.5 歳, n = 1）の計 15 頭を用いた。Iodixanol の 10 mg I/kg と inulin の 30 mg/kg を同時 bolus 静脈内投与し、投与前と投与 30, 60, 90 および 120 分後の計 5 回採血した（2 mL/回）。

2-3-5 GFR に対する体重、年齢、産次数および泌乳の影響

健康非泌乳牛（120 - 920 kg, 0.5 - 8.5 歳, n = 6 - 7）に iodixanol の 10 mg I/kg を静脈内投与し、投与前、投与後 60, 90 および 120 分後に計 4 回採血した（1 mL/回）。次に、健康乾乳および泌乳牛（450 - 850 kg, 1 - 6 歳, n = 7）を日乳量別に、4 つのカテゴリー（乾乳 dry, 30 kg 未満, 30 - 40 kg および 40 kg 以上）に分類し、

iodixanol の 10 mg I/kg と採血時間 60, 90 および 120 分を組み合わせる GFR を測定した。さらに、泌乳牛においては投与 1 と 2 時間後に採乳 (1 mL) し、HPLC 法 (“2-3-6” 参照) で乳汁 iodixanol 濃度を測定して、移行性の有無を調べた。

2-3-6 血清 iodixanol 濃度の測定と血清化学検査

血清および乳汁 iodixanol 濃度は、既報 [22] を修正 [29] して、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。すなわち、

① トリクロロ酢酸 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を濃度 20 %になるよう蒸留水で希釈し、20 %トリクロロ酢酸溶液を作成した。

② アセトニトリル (和光純薬工業株式会社, 大阪) を濃度 80 %になるよう水で希釈し、80 %アセトニトリル溶液を作成した。

③ 採血後、血液は室温に放置して凝固を確認後、遠心分離 (4°C, 100 × g, 15 分) で血清を分離した。除蛋白処理のため、血清 0.1 mL と 20 %トリクロロ酢酸溶液の 0.1 mL を混合し (1:1 の割合)、4°C下で 30 分間インキュベートして、遠心分離後 (4°C, 100 × g, 10 分) 上清を採取した。上清を HPLC 用バイアルの 100 μL インサートに 80 μL 分注し、流速 1 mL/分、注入量 10 μL として下記 HPLC システムで 20 分間測定した。測定終了後、標準検量線より血清 iodixanol 濃度を求めた。

④ 既知濃度の iodixanol 液 (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 および 640 μg I/mL) を作成するために、iodixanol 原液 (320 mg I/mL) を健康牛のプール血清で希釈して、上記“②”手順にしたがって除蛋白処理および HPLC 測定を行った。血清中 iodixanol 濃度から標準検量線を作成し、未知試料の濃度 (μg I/mL) を求めた。

⑤ 血清中 iodixanol 濃度の測定に用いた HPLC システムは、分離装置 (alliance™ Waters 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA), UV detector (Waters 996 Photodiode Array Detector, Waters), データ解析および機器制御 (MILLENNIUM³²® waters, Waters) から構成されている。分析カラムには、高純度シリカゲルベース逆相 HPLC カラムマイティシル (RP-18 GP, 250 × 4.6 mm, 5 μm, 関東化学薬品, 東

京) を用いた。HPLC 用移動相には 80 %アセトニトリル溶液を用いた。Iodixanol の検出は、波長 244 nm で行った。本条件下では、血清 iodixanol 濃度の測定限界は 5 µg I/mL であり、血清と血漿 iodixanol 濃度間には差異がないことを確認した。血清 iodixanol 測定における intra-assay と inter-assay の変動係数 (CV) は許容範囲内 (5 % 以下) にあった。

血清 inulin 濃度は市販キット (Diacolor-Inulin®, 東洋紡, 大阪) を用いて測定した。血清 inulin 濃度の測定限界は 20 µg/mL であった。なお, 血清 iodixanol と inulin は相互の各測定法および薬物動態に干渉しなかった [21] 。

血清 BUN と血清 creatinine 濃度は自動分析装置 (Dimension RxL, SIEMENS, München, Deutsch) で測定した。

2-3-7 GFR の算出

頻回採血法における全身クリアランス (Cl) は 1- コンパートメントおよび 2- コンパートメントモデルを基に算出した。すなわち, 各サンプル時間帯の血清 iodixanol または inulin 濃度より, 外挿法により線形台形公式で AUC を求めた。Cl は以下の式から算出した。

$$Cl = \frac{\text{Dose}}{\text{AUC}} \quad \dots (eq. 1)$$

Dose は投与量, 頻回採血法での Cl 値は, 以下 GFR と見なした。

2-4 1 回採血法による GFR の測定

頻回採血法 GFR 値, 投与量 (dose) および投与後 60, 90 あるいは 120 分 (t) 時の血清 iodixanol 濃度 (C_t) を以下の Jacobsson [23] の式 (eq. 2) へ代入し,

$$\text{GFR} = \frac{1}{t/Vd + 0.0016} \times \ln \frac{\text{dose}}{Vd \times C_t} \quad \dots (eq. 2)$$

その後、“eq. 2”を下記“eq. 3”のように変形して、

$$Vd = t \frac{Cl}{b} \quad \dots \quad (eq. 3)$$

【 $F(b) = \exp(b) - ab$ 】をみたす“b”をNewton法 [48, 52] によって解き、見かけ上の分布容積 (estimated Vd) を算出した。さらに、得られた解 (estimated Vd 値) が適切か Microsoft Office Excel 2007 (東京) の Goal-Seek 機能を用いて再確認を行った。その後、estimated Vd 値を縦軸に、各 C_t 値 ($C_{60 \text{ min}}$, $C_{90 \text{ min}}$ または $C_{120 \text{ min}}$) を横軸にとり scatter plot によって、

$$\text{Estimated Vd} = \alpha^{\beta C_t} \quad \dots \quad (eq. 4)$$

となる近似曲線を満たす estimated Vd 算出式を求めた (α と β は定数, eq. 4)。1 回採血法における GFR 値は、iodixanol の投与量 (dose, 10 mg I/kg), 投与後の採血時間 (t), その時の血清 iodixanol 濃度 (C_t) および $Vd = \text{estimated Vd}$ として “eq. 4” を上記の “eq. 2” へ再び代入することにより求めた。

GFR 値は体表面積換算 [$BSA = 0.09 \times (\text{体重})^{2/3}$, mL/min/m²] で表した [18]。

2-5 統計処理

得られたデータは平均 (mean) ± 標準偏差 (SD) で表し、3 群以上の場合は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Dunnett の多重比較検定を行い、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。Inulin と iodixanol による頻回採血法での GFR の比較と iodixanol による頻回採血法と 1 回採血法のそれぞれの GFR の比較は、Deming 直線回帰分析 [9] と Bland-Altman 法 [4, 5] で解析した。

3. 結果

3-1 Iodixanol の投与量の設定

Iodixanol を 5, 10 および 20 mg I/kg 投与した健康非泌乳非妊娠牛において、全

での用量で、血清 iodixanol 濃度は 60 - 150 分まで片対数上で線形性を示し消失した (Fig. 2A)。しかし、5 mg I/kg 投与群では 150 分時の血清 iodixanol 濃度が、検出限界 (5 µg I/mL) 近傍まで低下していた。

3-2 Iodixanol の血清消失推移と採血時間の設定

Iodixanol の 10 mg I/kg を健康非泌乳非妊娠牛に投与し、血清消失推移を調べたところ、分布相と排泄相の 2 相性を示した (Fig. 2B)。そこで、AUC を 1-コンパートメントモデルと 2-コンパートメントモデルでそれぞれ求め、GFR を算出 (“2-3-7” 参照) したところ、1-コンパートメントモデルの GFR 値 (195 - 220 mL/min/m²) が 2-コンパートメントモデルの GFR 値 (165 - 190 mL/min/m²) より 10 - 15 %高値を示した。

採血時間は、排泄相における 3 回あるいは 4 回採血ポイントで GFR 値を求め比較したところ、4 回採血の GFR 値 (207 ± 10 mL/min/m², Fig.3a) と 3 回採血法 GFR 値 (平均 GFR 範囲 : 180 - 260 mL/min/m², Fig 3b ~ 3e) との間に差異はみられなかった。

3-3 Inulin の血清消失推移

Inulin の 30 mg/kg を投与した健康非泌乳非妊娠牛において、平均血清 inulin 濃度は、iodixanol の場合と同様に 30 - 90 分後まで線形性を示して消失した (Fig. 4)。この採血時間帯における GFR 値は、202 ± 12 mL/min/m²であった。

3-4 Iodixanol と inulin の同時投与における GFR の相関性

Iodixanol の 10 mg I/kg と inulin の 30 mg/kg を同一牛に同時投与し、各 GFR 値を 3 回採血法で測定し、Bland-Altman 法で解析したところ 15 頭中 14 頭 (約 93%) が 95%信頼限界内であった (Fig. 5)。なお同時投与による有害症状は、臨床観察

上, 認められなかった。

3-5 GFR 値に対する体重, 年齢, 産次および泌乳の影響

体重, 加齢および産次数は GFR に影響を与えなかった (Fig.6A~C)。しかし, 体重 120 - 200 kg のウシでは, 有意差は見られないものの, 変動幅がやや大きかった (Fig. 6A)。乾乳牛と日乳量のカテゴリーに分類した泌乳牛との間にも, GFR 値に有意な差異は見られず (Fig. 6D), estimated Vd 値にも差 (50 - 200 mL/kg) は認められなかった。さらに, 泌乳牛の乳汁中から iodixanol は検出されなかった。

本実験条件下では, GFR 値に対し, 飼養地 (宮城県と岩手県), 季節 (春から秋) あるいは給与飼料を含む環境要因の違いは影響を及ぼさなかった。

3-6 1 回採血法と頻回採血法における GFR の相関性

健康非泌乳牛 (n = 81), 泌乳牛 (n = 21) および腎機能低下牛 (n = 7) を用い, 頻回 (3 回) 採血法で得た GFR 値, 採血時間 (投与 60, 90 あるいは 120 分後) およびその時点の血清 iodixanol 濃度を Jacobsson の式 (eq. 2) に代入し, estimated Vd (n = 109) を求めたところ,

$$\text{投与 60 分後採血 : estimated Vd} = 381.76 e^{-0.058Ct} \quad (r = 0.83)$$

$$\text{投与 90 分後採血 : estimated Vd} = 408.19 e^{-0.063Ct} \quad (r = 0.78)$$

$$\text{投与 120 分後採血 : estimated Vd} = 321.41 e^{-0.054Ct} \quad (r = 0.70)$$

であり, 投与 60 分後採血の相関係数が最も高かった。したがって, 以後の 1 回採血法における採血時間は, 投与 60 分後とした (Fig. 7)。なお, 腎機能低下牛の estimated Vd 値 (5 - 100 mL/kg) は健康牛 (50 - 250 mL/kg) に比べ, やや低値であったが (Fig. 7), 血清中に iodixanol の残留は, 投与 24 時間後において認められなかった。

1 回採血法と頻回採血法から求めた GFR の相関性を調べたところ, Deming 直

線回帰分析において、高い相関が認められた ($r = 0.96$, $P < 0.001$, Fig. 8A)。また、Bland-Altman 法では、2 頭以外 (107/109 サンプル, 約 98.2%), 95%信頼限界内にあった (Fig. 8B)。

4. 考察

ウシ獣医療において、簡便な GFR の測定法の確立を目的に、ホルスタイン種乳牛を用いて条件設定を行った。まず、頻回採血法における iodixanol の投与量と採血時間の設定を試みた。検討した 3 用量 (5, 10 および 20 mg I/kg) 全てで、血清 iodixanol 濃度は線形性を持って消失した。しかし、低用量の 5 mg I/kg では、測定限界近傍値が見られたため、HPLC における検出感度と全身曝露量を最小限にすることを考慮に入れ、iodixanol の投与量は 10 mg I/kg に設定した。なお、子牛の実験 (体重 40 - 120 kg, 6 ヶ月齢未満) では、40 mg I/kg (投与液量 : 0.125 mL/kg) が用いられているが [21] , ホルスタイン種成牛では、体重が 1,000 kg に達する個体も存在する (最大体重 920 kg) ことから、設定した 10 mg I/kg は妥当な投与量 (投与液量 : 0.031 mL/kg) と考えられた。

Iodixanol の血清消失推移を詳細に調べてみると、分布相と排泄相の 2 相性を示すことから、1- コンパートメントモデルと 2- コンパートメントモデルで AUC をそれぞれ求め、それぞれ GFR を算出したところ、1- コンパートメントモデルの GFR 値が 10 - 15 %高値を示した。しかし、2- コンパートメントモデルでは、頻回採血 (9 回前後) が必須であり、臨床応用は難しいと考えられた。したがって、排泄相が、線形性を示すことを考慮し、以後の検討には、1- コンパートメントモデルの排泄相で AUC を算出することにした。次に、排泄相における 3 回あるいは 4 回採血ポイントで GFR 値を求め比較したところ、差異は見られなかった。よって、4 回採血法の GFR 値に最も近い値を示し、最小時間で終了する投与 60, 90 および 120 分後を 3 点採血時間として採用した。

Iodixanol と inulin との同等性の確認に先立ち、まず inulin の全身クリアランスにおける測定条件を検討した。Inulin の用量は、30 mg/kg に設定し、血清消失推移および排泄相の線形性より、採血時間（30, 60 および 90 分後）を設定した。その後、iodixanol と inulin 両剤を同一牛に同時投与し、各 GFR 値を求め、Bland-Altman 法で解析したところ、高い同一性が見られた。したがって、iodixanol は、inulin に代わり、GFR 測定用 tracer として採用できると考えられた。

GFR の単位表示に関し、体表面積換算（BSA, mL/min/m²）は体重換算（mL/min/kg）より安定しているとの報告 [21] があり、また、ホルスタイン種乳牛の体重は 200 - 1,000 kg と大きな幅があるため、本研究では、BSA 換算値を用いた。

GFR の生理学的変動を明らかにするために、GFR 値に対する体重、加齢および産次数の影響を調べたが、変化は見られなかった。ヒトでは老齢期に入ると腎機能が低下することが指摘されているが、本実験で用いたホルスタイン牛は、全て十分な泌乳量のある現役の健康乳牛であることことから、加齢（最長：8.5 歳）の影響はみられなかったのかもしれない。ただ、体重 120 - 200 kg のウシでは、変動幅がやや大きかった。子牛（37 - 90 kg）での報告 [54] によると、体重増加とともに GFR 値が増加する傾向にあることが指摘されている。その理由として、急速な第一胃の成長に伴う総体液量の増加が個体差として現れた可能性が示唆されている。したがって、体重 120 - 200 kg での GFR 値の大きな変動は、成長によるものかもしれない。

乾乳牛と泌乳牛の間では、GFR 値に差異は見られなかった。また、泌乳牛では乳汁中から、iodixanol は検出されなかったことから、下記に述べるごとく、iodixanol の乳汁中への移行性は、本条件下では、ほぼ無視できると考えられた。

新たな iodixanol 単回静注・1 回採血法の式の確立に際し、Jacobsson の式 [23] に着目した。Jacobsson の式では、各個体の Vd 値が得られれば、投与量、採血時間

および血清濃度から正確な GFR 値が求められるという [15, 23]。そこで、Vd を算出するために、頻回採血法で得られた健康な非泌乳牛および泌乳牛と腎機能低下牛の累積 GFR データを、Jacobsson の式に代入し、Newton 法 [48, 52] で“解 (estimated Vd)”を求めることにより、以下の新たな 1 回採血式を確立することができた。

$$\text{GFR} = 1 / [60 / (381.76e^{-0.058Ct} + 0.0016)] \times \ln [10 / (381.76e^{-0.058Ct} \times Ct)] \cdots (\text{eq. 5})$$

1 回採血法と頻回 (3 回) 採血法からの GFR 値を、Bland-Altman 法で解析すると、得られた GFR 値のほとんどが 95 %信頼限界内に存在していた (Fig. 8B)。また、1 回採血法で求めた健康な非泌乳非妊娠ホルスタイン種乳牛 (体重 200 - 920 kg, 1 - 8.5 歳) の GFR 背景値 ($229.4 \pm 42.0 \text{ mL/min/m}^2$, $n = 81$) は、既報告の背景値 [1, 36] に類似していた。このことから、iodixanol を用いた 1 回採血法は頻回採血法の代替え法になり得ることが確認された。

これまでウシにおける iodixanol の分布容積 (Vd) を記載した論文は見当たらない。一般的に、1-コンパートメントモデルに適合する薬物の場合、Vd は、分布が血液だけに限られると、血液量に等しい 50 - 60 mL/kg、血液および間質液に均一に分布すると、細胞外液に等しい 200 mL/kg、細胞内まで均一に分布すると体液量に等しい 600 mL/kg、さらに特定の組織に高濃度に蓄積すると Vd は、1,000 mL/kg を超えるという。本研究での健康牛の投与 120 分までの estimated Vd は 1 頭を除いて 200 mL/kg 未満であることから、iodixanol は血中あるいは細胞外液に存在し、他組織に移行・蓄積することなく、そのまま尿中に排泄されると考えられた。

Iodixanol の残留性に関して、本薬の活性成分であるヨウ素は、厚生労働省から提示されている“ポジティブリスト”で除外物質 [25] とされていること、設定した iodixanol の投与量 10 mg I/kg は、ヒトの臨床用量 (32 g I/60 kg BW, 血管造影用) の約 1/15 に相当し、全身被曝量が極めて少ないこと、泌乳牛の乳汁および

腎機能低下牛の投与 24 時間後の血清には iodixanol は検出されないこと、例えば、iodixanol が乳汁へ移行したと仮定すると、Vd 値が増大し、血清 iodixanol 濃度と AUC 値は低下して GFR 値は増大すると考えられることから、泌乳牛と乾乳牛の間では estimated Vd 値に差 (50 - 200 mL/kg) が認められないこと、非イオン性ヨウ素はイオン性ヨウ素とは異なり、消化管からほとんど吸収されないことから、ホルスタイン種乳牛の乳汁や枝肉中の iodixanol の残留は、ほぼ無視できると考えられた。

以上、Jacobsson の式および estimated Vd から算出した GFR は、多くの仮設から成り立っているが、本実験結果から、ホルスタイン種乳牛の成績から、臨床応用が可能であると考えられた。

5. 小括

ホルスタイン種乳牛では、iodixanol の投与量を 10 mg I/kg、採血時間は、投与 60, 90 および 120 分後が最適であった。頻回採血法により得られた健康および腎機能低下牛のデータと Jacobsson の式を組み合わせ、1 回採血法の式 (ホルスタイン種 1 回採血式) を算出したところ、採血時間は投与 60 分後、estimated Vd 値は $381.76e^{-0.058Ct}$ であった。頻回採血法と 1 回採血法から求めた GFR 値の間には高い同一性がみられ、また健常背景値も既知報告とよく一致していたことから、1 回採血法は臨床応用が可能と結論した。

Table 1. Summarized profiles of Holstein dairy cows used in the respective studies

Study items	Pregnant (P) or Non-pregnant (Non)	n ¹⁾	Ranges			
			Body weight (kg)	Age (years)	BUN (mg/dL)	Serum creatinine (mg/dL)
Serum disappearance of iodixanol	Non	9	270-700	1-3	10-25	0.4-1.0
Serum disappearance of inulin	Non	3	270-700	1-3	10-25	0.4-1.0
Co-administration with iodixanol and inulin	Non	15 (1)	500-800	2-4	10-25	0.4-1.0
Body weight, age and parity	Non	55	120-920	0.5-8.5	10-25	0.4-1.0
Milk transfer	P	21	450-850	1-6	10-25	0.4-1.0
Clinical cases	Non/P	7 (1)	210-840	1.5-4	35-60	1.2-6.0

¹⁾Parenthesis represent the use of the same cow.

Table 2. Detailed profiles in clinical cases of female Holstein dairy cows used

Case No.	Pregnant (P) or Non-pregnant (Non)		Body weight (kg)	Age (years)	GFR (mL/min/m ²)	BUN (mg/dL)	Serum creatinine (mg/dL)	Clinical signs
1	Non		450	2.3	120.0	49.3	2.11	cystitis
2	P		840	4.0	65.8	60.0	5.98	proteinuria
3	Non		550	3.5	128.7	40.9	2.09	diarrhea
4	Non		280	2.1	109.3	36.2	1.58	diarrhea
5	Non		320	2.8	110.5	35.5	1.85	diarrhea
6	P		680	3.1	138.1	43.7	2.24	Hematuria
7	Non		210	1.5	143.1	36.6	1.72	diarrhea

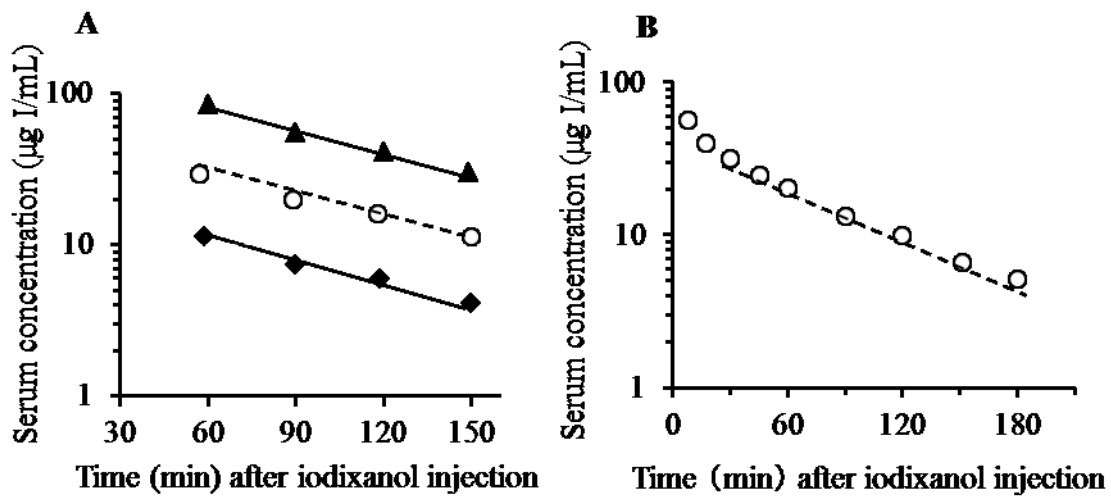


Fig. 2. Serum iodixanol disappearance curve with semilog linear shape in clinical healthy Holstein cows. (A) Serum mean concentration disappearance curve when intravenously administered 5 (closed diamonds), 10 (open circles), and 20 mg I/kg iodixanol (closed triangles). n = 3. (B) Serum disappearance concentration curve from iodixanol postinjection 10 minutes to 180 minutes later. Dotted line indicates the 1-compartment model. n = 3.

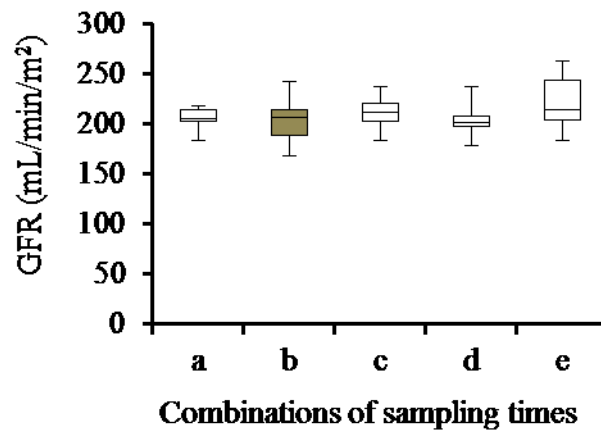


Fig. 3. Box plots showing GFR levels in the multisample method by the combination of various drawing blood time after iodixanol intravenous bolus injection to clinically healthy Holstein cows; (a) 60, 90, 120, and 150 min later, (b) 60, 90, and 120 later (gray box); (c) 60, 90, and 150 min later, (d) 60, 120, and 150 min later, and (e) 90, 120, and 150 min later. The horizontal bar in the box represents the median. The top or bottom in the box expresses 25 or 75 percentile. Upper and lower bars indicate maximum and minimum values, respectively. n = 3.

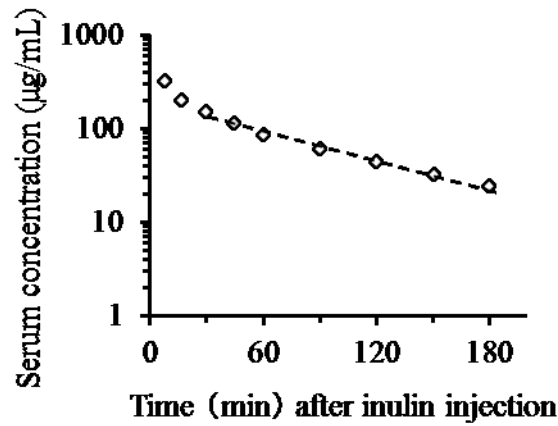


Fig. 4. Serum inulin disappearance curve with semilog linear shape in clinical healthy Holstein cows. Dotted line indicates the 1-compartment model. n = 3.

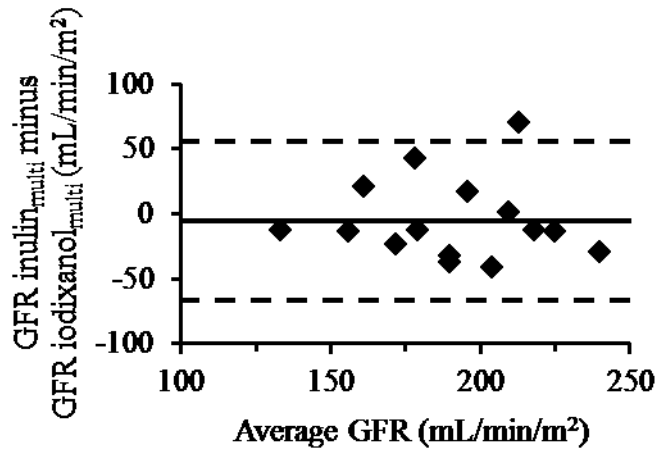


Fig. 5. Bland-Altman plot showing differences between GFR values by the multisample method using iodixanol and inulin after both reagents were co-administrated to healthy Holstein cows. Mean bias (solid line): -5.3. Upper and lower values indicate 95% limits of agreement: mean bias \pm 61.6 (dotted lines). n = 15.

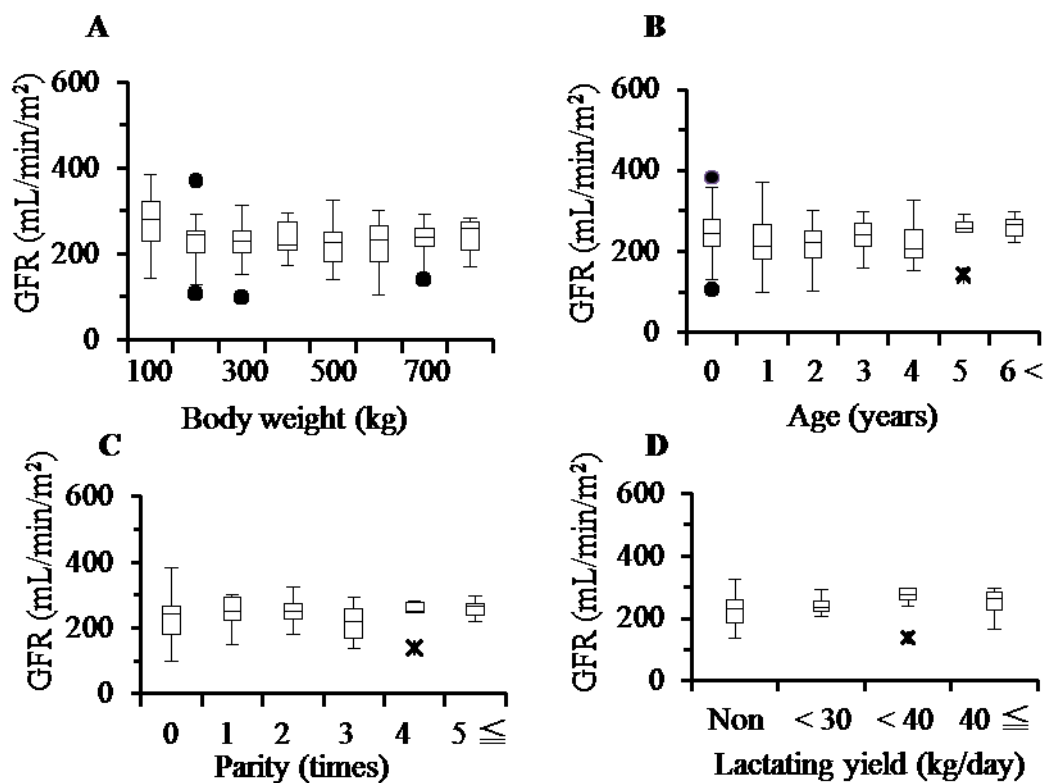


Fig. 6. Box plots representing influences that the body weight (A), age (B), parity times (C), or lactating yields (D) gives to GFR estimated by the multisample method using iodixanol in clinical healthy Holstein cows. Concerning lactating yields, dry, < 30 kg, < 40 kg, and $40 \leq$ kg means cows with non-lactation, less than 30 kg, less than 40 kg, and 40 kg or more milk per day, respectively. The horizontal bar in the box shows the median. The top or bottom in the box expresses 25 or 75 percentile. Upper and lower bars indicate maximum and minimum values, respectively. Point markers signify outliers and asterisks mean extreme outliers. $n = 6$ to 7 .

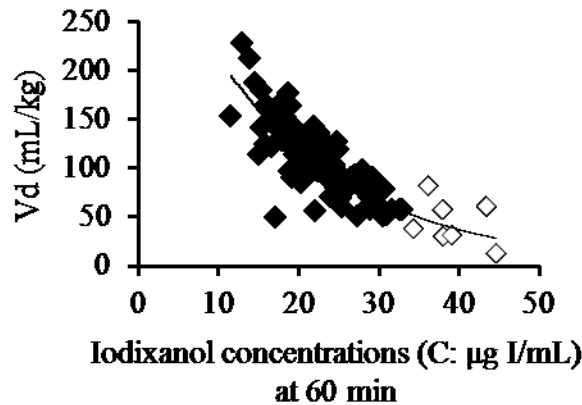


Fig. 7. Scatter plot showing relations of estimated distribution volumes (Vd) and serum iodixanol concentrations (C) at 60 min after iodixanol injection in healthy Holstein cows (◆) and cows with naturally-reduced renal function (◇). n = 109. Estimated $Vd = 381.76e^{-0.058C}$, $r = 0.83$ ($p < 0.01$).

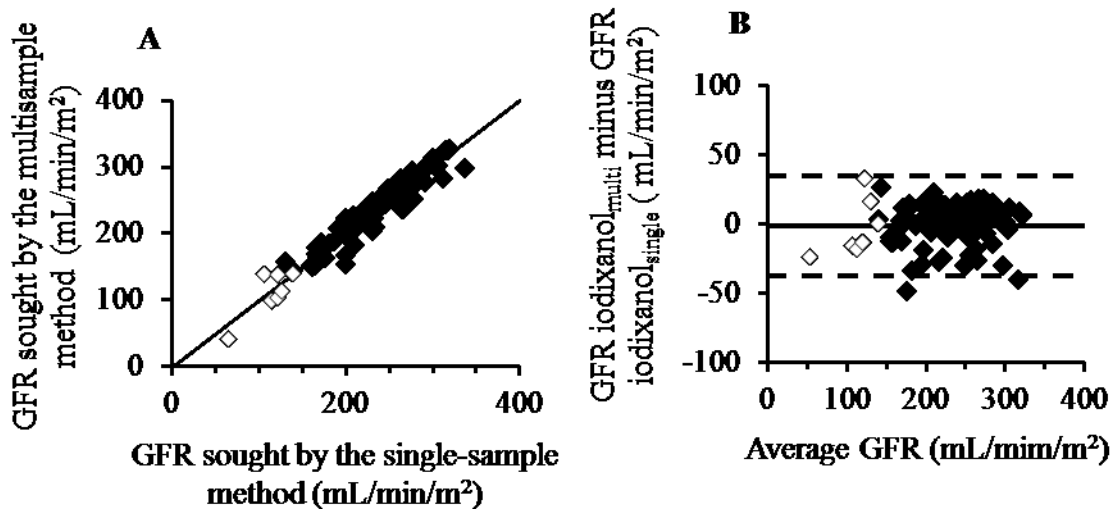


Fig. 8. Relations of GFR values estimated by the multisample method (GFR iodixanol_{multi}) and the single-sample method (GFR iodixanol_{single}) using iodixanol in healthy Holstein cows (◆) and cows with naturally-reduced renal function (◇). n = 109. (A) Scatter plot of GFR values between both methods by Deming's regression. $Y = 1.03x - 8.36$, $r = 0.96$ ($P < 0.001$); (B) Bland-Altman plot of differences between 2 methods. Mean bias (solid line): -0.9 . Upper and lower values indicate 95% limits of agreement: mean bias ± 29.2 (dotted lines).

第2章 黒毛和種肉用牛における腎糸球体濾過量（GFR）の測定

1. 小序

第1章では、ホルスタイン種乳牛におけるGFR測定法の確立を目的に、まずtracerのiodixanolとinulinの投与量および頻回採血法における採血時間を設定した。その後、両tracerを同一牛に同時投与することにより、iodixanolがinulinに代わり、GFR測定に応用できることを証明した。さらに、健康牛と腎機能低下牛の頻回採血法のデータとJacobssonの式[23]を組み合わせ、新たな1回採血法によるGFR算出式のホルスタイン種乳牛1回採血式（以下、ホルスタイン種1回採血式）を作出した。これらのホルスタイン種乳牛での成績から、ヒトでの標準GFR tracerであるinulinは、溶解あるいは測定に時間を要し、投与量（iodixanol: 0.031 mL/kg に対し inulin: 0.3 mL/kg）も多く、寒冷地では投与中に結晶が析出し易いため、ウシ獣医療の現場応用・定着化は難しいと考えられた。

本章では、ウシのGFR値に品種・系統差が存在するかを明らかにすることを目的に、黒毛和種肉用牛（以下、肉用牛）を用いて、第1章でのホルスタイン種乳牛におけるアプローチ法に準拠し、各種測定条件の設定を行った。まず、健康肉用牛を用いて、iodixanolおよびinulinの血清消失挙動、採血時間の設定、両tracerの同一牛に同時投与でのGFR値の同一性ととともに体重、加齢および産次数の影響を頻回採血法によって調べた。その後、ホルスタイン種1回採血式が肉用牛においても共通して利用できるか、健康および腎機能低下症例を用いて、頻回採血法からのGFR値との同一性を調べた。

肉用牛のGFR測定に関する報告はこれまで見当たらない。したがって、肉用牛でGFR測定が可能となれば、肥育農場で発生頻度の高い尿石症をはじめとする腎機能低下症例の診断に応用できる可能性がある。本章では、これら臨床症例を収集し、GFR測定の臨床学的妥当性についても検証した。

2. 材料および方法

2-1 使用薬物

第1章の“2-1”と同様の iodixanol および inulin を使用した。

2-2 使用動物

白石地区の農場（宮城）と岩手大学附属フィールド リサーチ センター御明神農場（雫石，岩手）で飼養されている健康な肉用牛 60 頭を用いた（Table 3）。6 ヶ月齢未満の子牛には市販の代用乳と乾草を給与し，6 ヶ月齢以上の育成および成牛は自給粗飼料とビタミンとミネラル添加した市販の配合飼料を給与し，飲水は自由摂取させた。また，収集した腎機能低下臨床例は 11 頭で，その内訳は，4 頭が血尿，膀胱炎，排尿障害または尿毒症を呈する尿石症，2 頭が下痢に伴う腎機能低下，1 頭が原因不明の腎機能低下，2 頭が老齢（19 と 26 歳）による腎機能低下および 2 頭がクローディン 16 因子欠損症 [17] であった（Table 3）。全症例で BUN（30 mg/dL 以上）と血清 creatinine（1.2 mg/dL 以上）の上昇が認められ，一般診察，腎臓と膀胱の触診，血液・尿検査あるいは遺伝子検査により診断した。牛の取り扱いは，全て日本実験動物学会のガイドライン [24] に準拠し，岩手大学実験動物委員会で承認（A201139）されている。

2-3 全身クリアランス法（頻回採血法）による GFR の測定

2-3-1 Iodixanol または inulin の血清消失推移

前章の iodixanol（“2-3-1”）あるいは inulin（“2-3-3”）の用量反応データを参考に，iodixanol と inulin の用量は 1 用量のみとした。健康な肉用牛（n = 3）に iodixanol の 10 mg I/kg を頸静脈内に単回投与し，反対側の頸静脈に留置したカニューレ（UK-カテーテルキット，14G，ユニチカ，愛知）を介し，投与前，投与 5，15，30，45，60，90，120，150 および 180 分後の計 10 回採血（1 mL）した。

同様に、inulin の 30 mg/kg を健康な肉用牛 (n = 3) に単回静注し、計 10 回採血した。

2-3-2 Iodixanol と inulin の同時投与における GFR の相関性

健康な肉用牛 (n = 11) に iodixanol の 10 mg I/kg と inulin の 30 mg/kg を静脈内 bolus 投与し、投与前、投与 30, 60, 90 および 120 分後に採血 (2 mL) を計 5 回行った。

2-3-3 GFR に対する体重、年齢および産次の影響

健康な肉用牛 (n = 43) に iodixanol の 10 mg I/kg を静脈内 bolus 投与し、投与前、投与 60, 90 および 120 分後に採血 (1 mL) を行い、GFR に対する体重、加齢および産次数の影響を調べた。

2-3-4 腎機能低下牛における GFR

尿石症、クローディン 16 因子欠損症、下痢に伴う腎機能低下、原因不明の腎機能低下および老齢により腎機能が低下した計 11 頭に iodixanol の 10 mg I/kg を静脈内 bolus 投与し、投与前、投与後 60, 90 および 120 分時に採血 (1 mL) を行い、GFR を求めた。

2-3-5 血清 iodixanol 濃度の測定と血清化学検査

血清 iodixanol, inulin, BUN, creatinine 濃度は第 1 章で記述 (“2-3-6”) に準じて測定した。なお、肉用牛における intra-assay と inter-assay の変動係数 (CV) は許容範囲内 (5% 以下) であり、また、ホルスタイン種乳牛と差異はみられなかった。

2-3-6 GFR の算出

第1章の“eq. 1” (“2-3-7”) に従い、GFR (mL/min/m²) を算出した。

2-4 ホルスタイン種1回採血式によるGFRの算出

第1章の“eq. 2 および eq. 5” に従い、GFR を算出した。すなわち、

$$\text{GFR} = \frac{1}{t/V_d + 0.0016} \times \ln \frac{\text{dose}}{V_d \times C_t}$$

Iodixanol 注射量 (dose: 10 mg I/kg), t (採血時間: 60 分), t 時間 (60 分) の血清 iodixanol 濃度 (C_t) および算出した分布容積 (V_d = 381.76e^{-0.058C_t}) を用いた。

2-5 統計処理

得られた数値データは平均値 (mean) ± 標準偏差 (SD) で表した。3 群以上の比較は一元配置分散分析と Dunnett's test を行い、P < 0.05 で有意差ありとした。Inulin と iodixanol による頻回採血法 GFR の比較、またはホルスタイン種1回採血式と頻回採血法 GFR の比較は、Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて Deming 直線回帰分析 [9] と Bland-Altman 法 [4, 5] により行った。

3. 結果

3-1 Iodixanol あるいは inulin の血清濃度消失

Iodixanol の 10 mg I/kg を投与した健康肉用牛において、血清濃度は投与 45 - 180 分まで半対数の線形を示して消失した (Fig. 9A)。Inulin の 30 mg/kg を投与すると、投与 30 - 180 分後まで血清濃度は直線的に低下した (Fig. 9B)。Iodixanol 投与 30 - 120 分後までの 1-コンパートメントモデルにおける 4 点採血法 GFR 値 (172.4 ± 10.9 mL/min/m²) と 3 点採血法 GFR 値 (175.2 ± 10.0 mL/min/m²) に差は認められなかった。Inulin についても、ほぼ同様の値が得られた。

3-2 Iodixanol と inulin の同時投与における GFR の相関性

Iodixanol の 10 mg I/kg と inulin の 30 mg/kg を同一健康肉用牛に同時静脈内投与すると、全てのウシの GFR 値が 95%信頼限界内に認められた (Fig. 10)。Iodixanol により求めた GFR 値 (164.9 ± 24.6 mL/min/m²) と inulin での GFR 値 (164.8 ± 20.0 mL/min/m²) の間には差異はなかった。また、同時投与による異常な臨床症状は観察されなかった。

3-3 GFR における体重、年齢および産次数の影響

肉用牛の GFR に対し、体重、加齢および産次数は影響しなかった (Fig. 11)。しかし、体重 300 kg 未満で 1 歳未満の肉用牛の GFR 値は、変動幅が大きかった (Fig. 11)。なお、本条件下では、飼育地 (宮城と岩手) の影響は見られなかった。

3-4 腎機能低下牛における GFR

尿石症、クローディン 16 因子欠損症、下痢に伴う腎機能低下および原因不明の腎機能低下牛では、GFR 値は低下し、これに対し、BUN および血清 creatinine 濃度の上昇がみられた。この場合、GFR と BUN 間、または GFR と血清 creatinine 間には、ほぼ対応した変化が認められた (Fig. 12 と Table 4)。

3-5 頻回採血法とホルスタイン種 1 回採血式における GFR の相関性

健康な肉用牛と腎機能低下牛に iodixanol を投与し、頻回採血法で求めた GFR 値は、ホルスタイン種 1 回採血式で求めた GFR 値との間に Deming 直線回帰分析で良好な相関性 ($r = 0.89$, $P < 0.01$, $n = 71$, Fig. 13A) が認められた。Bland-Altman 法では、71 頭中 65 頭 (約 92%) が 95 %信頼限界にあり、両法間の同一性が確認された (Fig. 13B)。

健常背景値を 2 法で求めたところ、体重 250 - 700 kg, 1 - 6 歳の健康肉用牛 60

頭における iodixanol 頻回採血法の GFR 値 ($177.5 \pm 56.4 \text{ mL/min/m}^2$) とホルスタイン種 1 回採血式 GFR 値 ($174.2 \pm 64.5 \text{ mL/min/m}^2$) は近似していた。

計算により求めた estimated Vd は、健康牛 ($138 \pm 26 \text{ mL/kg}$) が腎機能低下牛 ($38 \pm 8 \text{ mL/kg}$) より有意に高値であった。

4. 考察

第 1 章において、ホルスタイン種乳牛の GFR を iodixanol と Jacobsson の 1 回採血式を基に、新たな式 (ホルスタイン種 1 回採血式) を作出した。本章では、肉用牛とホルスタイン種乳牛の品種間で、ホルスタイン種 1 回採血式が共通して利用できるか、および品種間で GFR 値に差異があるか検討した。

肉用牛に iodixanol を静脈内 bolus 投与したところ、ホルスタイン種乳牛と同様の 2 相性の消失を示した (Fig. 2B と Fig. 9A)。排泄相の 3 点あるいは 4 点採血時間を、1-コンパートメントモデルに当てはめ GFR を求めたところ、採血時間帯で GFR 値に差異はみられなかった。したがって、肉用牛においてもホルスタイン種乳牛同様、iodixanol の投与量は 10 mg I/kg 、採血時間は 3 点 (投与 60, 90 および 120 分) で良いと考えられた。また、inulin における検討でも、ホルスタイン種乳牛の成績とよく一致し (Fig. 4 と Fig. 9B)、inulin の投与量は 30 mg/kg 、採血時間は 3 点 (投与 30, 60 および 90 分) と変更の必要性がないと考えられた。

Iodixanol と inulin を同一個体に同時投与し、各 GFR 値を Bland-Altman 法で解析したところ、全ての値が 95%信頼限界内 (Fig. 10) にあった。また、GFR 背景値も iodixanol と inulin では良く一致していた。このことから、iodixanol は inulin の代わりに、肉用牛においても tracer として使用できることが明らかとなった。

肉用牛の GFR に対する体重、加齢および産次数の影響は見られなかったが、1 歳未満 (体重 300 kg 未満) の個体の GFR は、ホルスタイン種乳牛と同様に (Fig. 6A, B)、変動幅が大きかった。この理由として、出生後、哺乳から固形飼料への

飼料の変更に伴う解剖学的な第一胃と第四胃のバランスの変化，第一胃の急速な成長 [54] ，総体液量の増加あるいは腎臓の成長による機能面での急激な変動（腎血流量，GFR および腎尿細管の再吸収分泌能の増加）が推察された [49] 。

腎機能低下症例の結果から，例数は少ないものの尿石症の診断とその病態を把握するうえで，GFR 測定は有用な手法と考えられた。しかし，本研究では，完全尿閉症例のみであるため，不完全尿閉（淋漓排尿），腎前性あるいは腎後性病態を考慮した上で最終診断を行う必要があるかもしれない。したがって，尿石症のマーカーとしては，今後さらなる検討が必要である。

ホルスタイン種 1 回採血式から求めた GFR 値と頻回採血法からの GFR 値の間には，Deming 直線回帰分析で良好な相関性 ($r = 0.89$, $P < 0.01$) がみられ，また Bland-Altman 法においても，71 頭中 65 頭（約 92%）が 95 %信頼限界内にみられた。このことから，ホルスタイン種 1 回採血式は，頻回採血法に代わり，肉用牛でも応用可能であることが判明した。

ホルスタイン種 1 回採血式では，個体毎に estimated Vd 値を血清 iodixanol 濃度から求めることが出来るが，一般的に，薬物の Vd 値が 50 - 60 mL/kg では血中のみに，600 mL/kg 以下では間質（細胞外）液中に分布存在すると言われている [10] 。腎機能低下牛の iodixanol の estimated Vd 値は，40 mL/kg 前後であることから，健康牛に比べ血中に長く残留していると考えられたが，24 時間後には消失することから他の組織への分布はないと考えられた。

同一体重（250 - 700 kg）で同年齢（1 - 6 歳）の健康な肉用牛（Table 3）とホルスタイン種乳牛（Table 1）の背景 GFR 値を比較すると，興味深いことに，頻回採血法およびホルスタイン種 1 回採血式とも，肉用牛（平均値：176 mL/min/m², n = 60）の方が，ホルスタイン種乳牛（229 mL/min/m², n = 81，第 1 章）に比べ明らかに低値を示した（Table 5）。この差異は，成長ホルモン量の差 [46] ，泌乳量に関連した尿量の差，乾物摂取量と飲水量の差など多くの要因の関与が考えられたが，

肉用牛では血尿，膀胱炎，排尿障害あるいは尿毒症を発現する尿石症の発生頻度がホルスタイン種乳牛に比べ高いことから，短期間での飼料中の濃厚飼料の多給に起因することが推測された。今後，種々の環境下で飼養されている肉用牛の GFR 値を広範に調べ，今回得られたデータとの齟齬がないか検証する必要がある。

肉用牛での iodixanol の残留性に関しては，ホルスタイン種乳牛同様，iodixanol の投与量は極めて低いこと，血清中 iodixanol 濃度は 24 時間後には検知できないこと，上述したように estimated Vd 値の経時推移から考えて，枝肉中への iodixanol の残留はほぼ無視できると思われた。

5. 小括

肉用牛における GFR 値は，iodixanol の血清消失推移と inulin で求めた GFR 値の同一性から，ホルスタイン種乳牛と同様の iodixanol の投与量 10 mg I/kg と採血時間 60, 90 および 120 分後で測定が可能であった。本条件下で求めた頻回採血法による GFR 値は，“第 1 章”で作出したホルスタイン種 1 回採血式で求めた GFR 値とよく一致していた。したがって，ホルスタイン種 1 回採血式は，肉用牛の GFR 測定にも利用できるかと判断した。

Table 3. Summarized profiles of Japanese black beef cows used in the respective studies

Study items	Sex	n ¹⁾	Ranges			
			Body weight (kg)	Age (years)	BUN (mg/dL)	Serum creatinine (mg/dL)
Serum disappearance	F	6 (6)	410-510	1-3	10-25	0.4-1.0
Co-administration with iodixanol and inulin	F	11(4)	200-360	1-2	10-25	0.4-1.0
BW, age and parity	F	43 (31)	120-810	0.3-8	10-25	0.4-1.0
Clinical cases	F/C	11(1)	40-760	0.1-26	30-80	1.2-8.0
Clinically healthy cows	F	60 (41)	250-700	1-6	10-25	0.4-1.0

F, female; C, castrated male

¹⁾Parentheses represent use of the same cow.

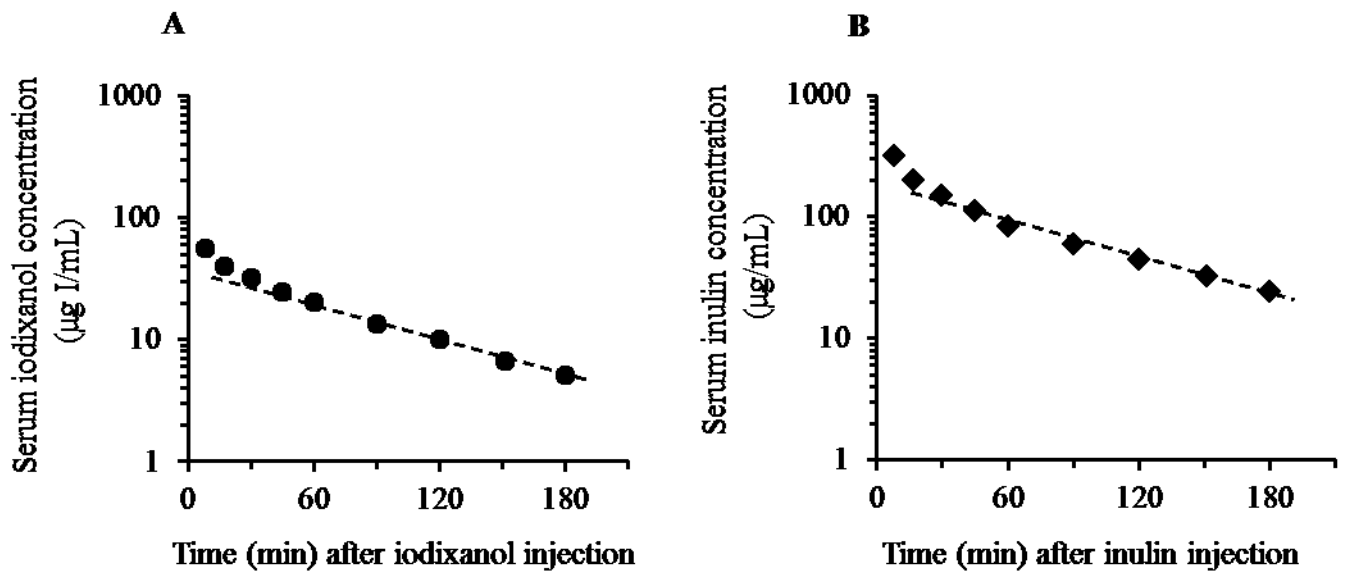


Fig. 9. Serum disappearance curve with semilog linear shape in healthy beef cows. (A) Serum mean iodixanol disappearance curve when intravenously administered 10 mg I/kg. n = 3 (B) Serum mean inulin disappearance curve when intravenously administered 30 mg/kg. n = 3.

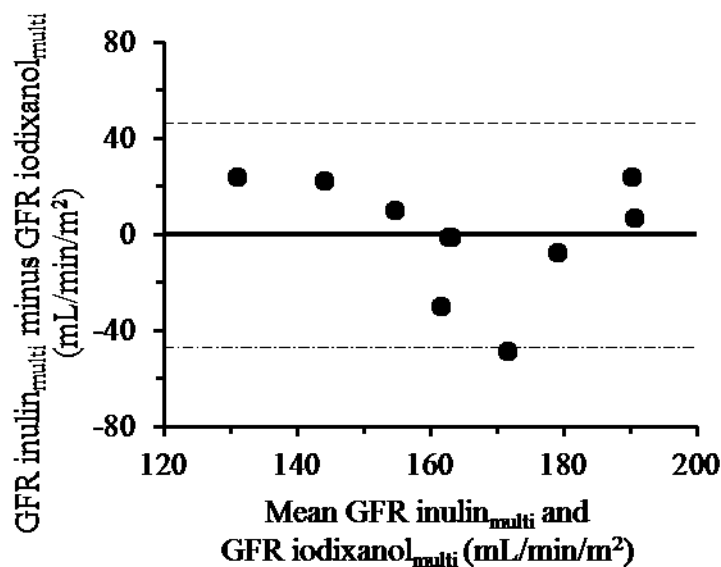


Fig. 10. Bland-Altman plot showing the differences between GFR values using the multisample methods using inulin (GFR_{inulin_multi}) and iodixanol (GFR_{iodixanol_multi}) in healthy beef cows. Mean bias (solid line): 0.16. Upper and lower values represent 95% limits of agreement: mean bias ± 46.5 (dotted lines). n = 11.

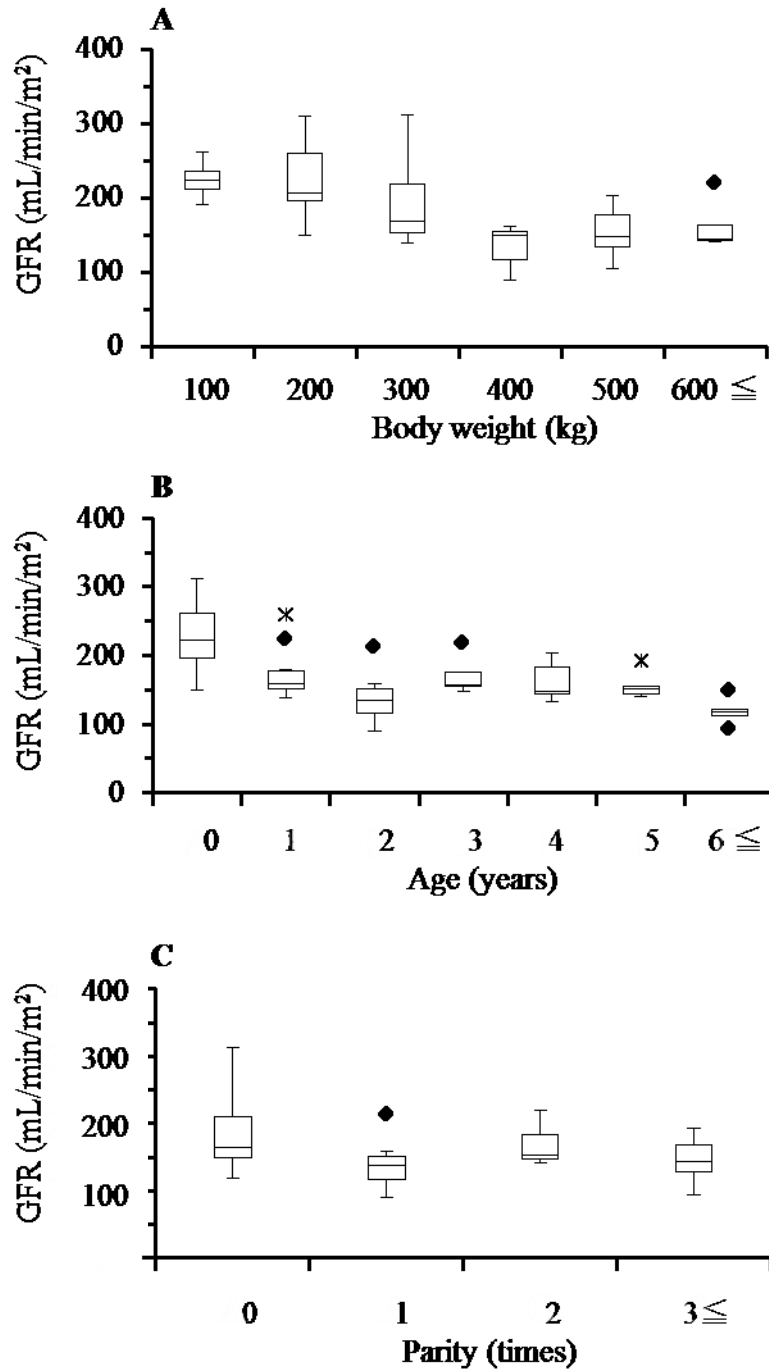


Fig. 11. Box plots representing influences that the body weight gains (A), age (B) or parity times (C) gives to GFR estimated by the multisample method using iodixanol in clinical healthy beef cows. Median and quartiles are displayed in the box. Upper and lower bars represent maximum and minimum values, respectively. Diamond markers indicate outliers, and asterisks indicate extreme outliers. $n = 6$ to 8 .

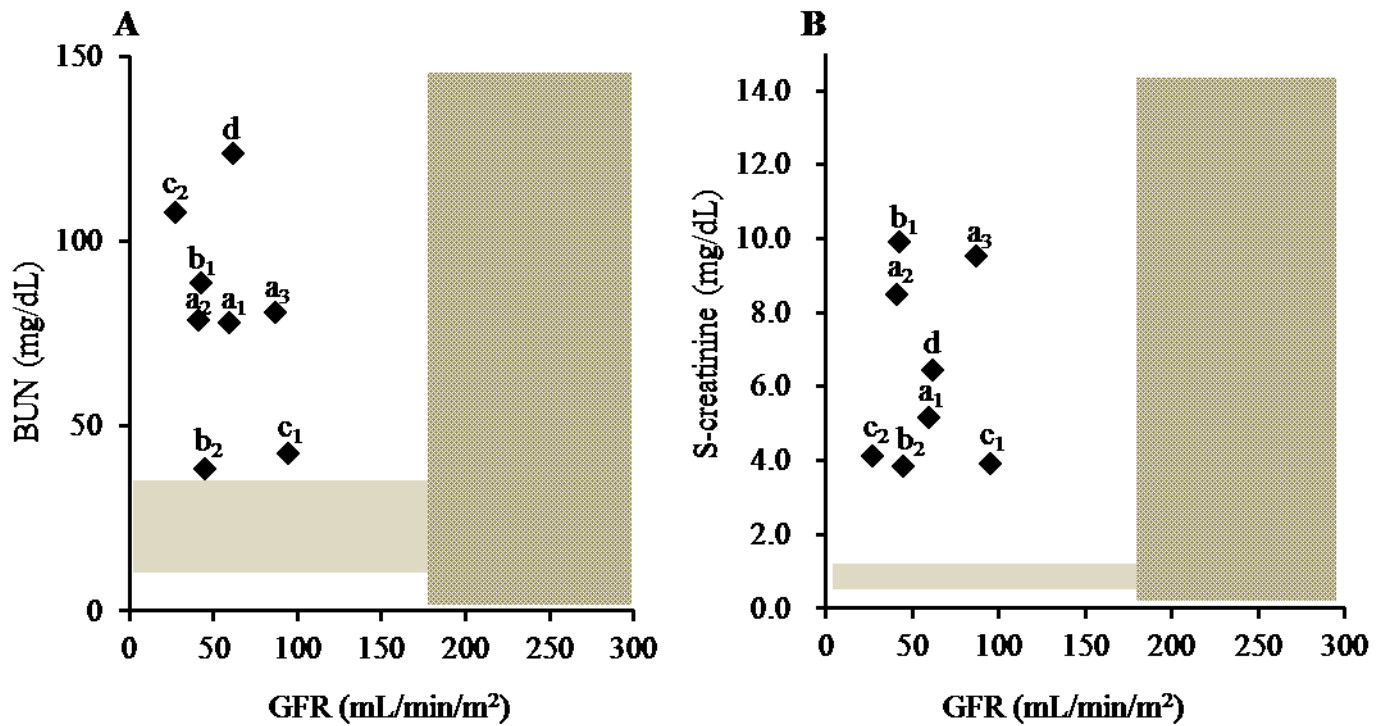


Fig. 12. Relations of GFR values estimated by the integrated formula and BUN (A) or creatinine (B) in beef cows with naturally-reduced renal function. a₁₋₃: urolithiasis; b₁ and b₂: Claudin-16 deficiency; c₁ and c₂: diarrhea; d: Unknown origin. Stipple areas represent the reference ranges based on the background laboratory data. S: serum

Table 4. Detailed profiles in clinical cases of Japanese Black beef cows

No.	Birth date	Body weight (kg)	Clinical diagnosis	Sampling date	GFR _{multi} (mL/min/m ²)	BUN (mg/dL)	Serum creatinine (mg/dL)
a1	2011/12/10	130	Urolithiasis	2012/6/29	59.7	77.7	5.14
a2	2011/3/6	263	Urolithiasis	2012/1/4	41.3	78.3	8.48
a3	2009/9/20	757	Urolithiasis	2011/10/28	87.1	80.6	9.50
b1	2010/7/22	140	Claudin-16 deficiency	2011/4/1	42.7	88.4	9.89
b2	2010/7/22	130	Claudin-16 deficiency	2011/5/12	45.0	38.2	3.82
c1	2012/7/1	43	Diarrhea-related reduced kidney function	2012/8/1	95.0	42.2	3.91
c2	2011/9/5	69	Diarrhea-related reduced kidney function	2011/12/16	27.3	107.6	4.12
d	2012/9/20	19	Reduced renal function of unknown origin	2012/10/9	61.9	123.6	6.42

GFR_{multi}: GFR estimated by the multisample method using iohexanol

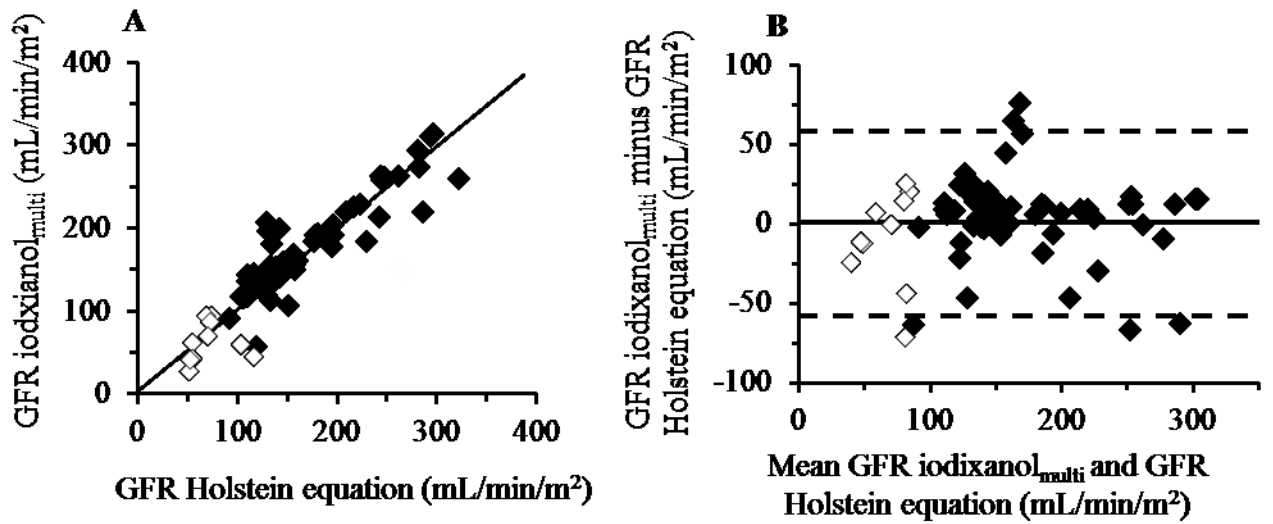


Fig. 13. Relations of GFR values estimated by the multisample method using iodixanol (GFR iodixanol_{multi}) and Holstein equation (GFR Holstein equation) based on the single sample method using iodixanol for Holstein dairy cows in healthy beef cows (◆) and cows with naturally-reduced renal function (◇). $n = 71$. (A) Scatter plot of GFR values between both methods by Deming's regression. $Y = 0.99x - 2.87$, $r = 0.89$ ($P < 0.01$). (B) Bland-Altman plot of differences between 2 methods. Mean bias (solid line): 0.01. Upper and lower values indicate 95% limits of agreement: mean bias \pm 51.6 (dotted lines).

第3章 統合式を用いた乳牛および肉用牛の腎糸球体濾過量（GFR）の測定

1. 小序

第1章では、ホルスタイン種乳牛のGFRを測定するために、1回採血式（ホルスタイン種1回採血式）を作出し、GFRが簡便に測定できることを示した。第2章では、黒毛和種肉用牛においても、ホルスタイン種1回採血式が応用可能であり、腎機能低下牛では、明確にGFR値が低下していることを確認した。さらに、同一の体重および年齢の健康なホルスタイン種乳牛と肉用牛では、GFR背景値に差異があり、ホルスタイン種乳牛が高値を示し、品種差があることを明らかにした。これら成績を考え合わせると、tracerとしてiodixanolを用いると、ホルスタイン種乳牛と肉用牛とでは、同一の用法用量でGFRを測定できることが判明した。

本章では、Jacobssonの式 [23] の普遍性あるいは妥当性の検証を目的として、第1-2章で用いた健康および腎機能低下のホルスタイン種乳牛と肉用牛を合わせて、新たな1回採血統合式（以下、統合式）の作出を試みた。その後、健康牛を用いて、頻回採血法、ホルスタイン種1回採血式および統合式で求めたGFR値を比較した。これら3法で求めた各GFR値が同一であれば、種々の不確定因子はあるもののJacobssonの式の妥当性を証明できることになる。

ヒトでは、GFR値と血清creatinine値の間には、GFR値が正常背景値の70-75%低下して、初めて血清creatinine値が上昇する古典的“ドグマ”が存在する [49]。これまで、iodixanolとJacobssonの式の組み合わせで、ラット [29, 30]、ウサギ [37]、ネコ [28, 31] および子牛 [21] のGFR値を1回採血法で測定し、血清creatinine値との間で、このドグマがほぼ検証されている。したがって、ウシにおいて、追証できれば、GFR測定は早期の腎機能障害の診断や腎残存予備能の把握に有用であることの証明の一つと成りうると考えられる。

2. 材料および方法

2-1 使用薬物

第1章の“2-1”と同様の iodixanol を使用した。

2-2 使用動物

白石地区（宮城）および岩手大学農学部附属フィールド リサーチ センター 御明神農場（雫石，岩手）で飼養されている体重 200 - 900 kg, 0.6 - 8 歳のホルスタイン種乳牛 105 頭（健康牛 99 頭と腎機能低下牛 6 頭）および黒毛和種牛肉用牛 72 頭（健康牛 63 頭と腎機能低下牛 9 頭）の計 177 頭を用いた。これら動物の中には，新たに追加した健康ホルスタイン種乳牛の 10 頭と肉用牛の 17 頭が含まれている。健康牛は身体検査，血液検査および尿検査で異常が見られないものとした。腎機能低下牛は，第1章と第2章の“2-2”に記載されている牛を用いた。飼育条件も同様である。

牛の取り扱いは，日本実験動物学会のガイドライン [24] に準拠し，岩手大学実験動物委員会で承認されている（A201027 および A201139）。

2-3 血清 iodixanol 濃度の測定と血清化学検査

血清 iodixanol 濃度，BUN および血清 creatinine 濃度は第1章で記述した手法（“2-3-6”）に準じて測定した。

2-4 GFR の測定

2-4-1 頻回採血法による GFR の算出

ホルスタイン種乳牛および肉用牛の計 177 頭に iodixanol の 10 mg I/kg を静脈内 bolus 投与し，投与前，投与 60, 90 および 120 分後に採血した。GFR の算出は，

第1章の“*eq. 1*” (“2-3-7”)を用い、GFR値は、体表面積換算 (mL/min/m²) [18] と体重換算 (mL/min/kg) で表した。

2-4-2 ホルスタイン種1回採血式によるGFRの算出

ホルスタイン種乳牛および肉用牛の計177頭を用い、“2-4-1”のデータ(頻回採血法)を基に、“*eq. 2*”(第1章参照)を用い、GFRを算出した。すなわち、

$$\text{GFR} = \frac{1}{t/V_d + 0.0016} \times \ln \frac{\text{dose}}{V_d \times C_t} \quad \dots (\text{eq. 2})$$

iodixanolの投与量 (dose, 10 mg I/kg), 投与後の採血時間(採血時間: 60分), その時点の血清iodixanol濃度 (C_t) および算出した分布容積 (estimated V_d = 381.76e^{-0.058C_t}) を代入した。GFR値は、体表面積換算 (mL/min/m²) と体重換算 (mL/min/kg) で表した。

2-4-3 統合式によるGFRの算出

ホルスタイン種乳牛および肉用牛の計177頭を用い、上記“2-4-1”のデータ(頻回採血法)を基に、GFR値、iodixanolの投与量 (dose, 10 mg I/kg) および投与後60, 90あるいは120分 (t) 時の血清iodixanol濃度 (C_t) をJacobsson [23] の式 (*eq. 2*) へ代入し、“*eq. 3*”のように変形した。

$$V_d = t \frac{Cl}{b} \quad \dots (\text{eq. 3})$$

得られた解 (estimated V_d 値) を縦軸に、各 C_t 値 (C_{60 min}, C_{90 min} または C_{120 min}) を横軸にとり scatter plot によって、

$$\text{Estimated } V_d = \alpha^{bC_t} \quad \dots (\text{eq. 4})$$

となる近似曲線を満たす estimated V_d 算出式を求めた。GFR値は、iodixanolの投与量 (dose, 10 mg I/kg), 投与後の採血時間 (t), その時の血清iodixanol濃度 (C_t) および V_d = estimated V_d として “*eq. 4*” を上記 Jacobsson [23] の式の “*eq. 2*” へ

再び代入することにより求め、体表面積換算 (mL/min/m²) と体重換算 (mL/min/kg) で表した。

2-4-4 統合式と頻回採血法における GFR の相関性

ホルスタイン種乳牛および肉用牛の計 177 頭を用い、頻回採血法と統合式から求めた GFR の同一性を調べた。

2-4-5 頻回採血法、ホルスタイン種 1 回採血法および統合式における GFR と品種差

健康なホルスタイン種乳牛および肉用牛の計 177 頭を用い、頻回採血法、ホルスタイン種 1 回採血法および統合式の 3 法から求めた GFR 背景値を、体表面積換算 GFR と体重換算 GFR で求め比較した。

2-4-6 統合式による GFR と BUN あるいは血清 creatinine 濃度の相関性

健康な肉用牛 63 頭と腎機能低下牛 9 頭の計 72 頭を用い、統合式で求めた GFR 値と BUN あるいは血清 creatinine 濃度との相関性を調べた。

2-5 統計処理

数値データは平均値 (mean) ± 標準偏差 (SD) で表した。頻回採血法 GFR 値と統合式 1 回採血法 GFR 値との比較は、Prism5 を用いて Deming 直線回帰分析 [9] と Bland-Altman 法 [4, 5] で行った。

3 結果

3-1 統合式による estimated Vd の算出

Estimated Vd (n = 177) を求めたところ、

投与 60 分後採血 : $\text{estimated Vd} = 335.46e^{-0.054 Ct}$ ($r = 0.81$)

投与 90 分後採血 : $\text{estimated Vd} = 350.84e^{-0.054 Ct}$ ($r = 0.81$)

投与 120 分後採血 : $\text{estimated Vd} = 362.82e^{-0.053Ct}$ ($r = 0.73$)

であり、投与 60 と 90 分後採血の相関係数が最も高かったが、時間的な利便性を考慮し、統合式における採血時間は、投与 60 分後とした (Fig. 14)。Estimated Vd 値は、腎機能低下牛 (平均値 : 35 mL/kg) は健康牛 (143 mL/kg) に比べ、低値を示した。

3-2 統合式と頻回採血法における GFR の相関性

統合式と頻回採血法から求めた GFR 値の相関を調べたところ、Deming 直線回帰分析では良好な相関性 ($y = 1.02x - 4.03$, $r = 0.93$, $P < 0.001$) が認められた (Fig. 15A)。Bland-Altman 法では、95%信頼限界内に約 96%のウシ (170/177 頭) が存在した (Fig. 15B)。

3-3 頻回採血法、ホルスタイン種 1 回採血法および統合式における GFR と品種差

3法から求めた健康なホルスタイン種乳牛と肉用牛の GFR 背景値を (Table 5) に示した。両品種の GFR 値には、3 法間で差はみられなかったが、ホルスタイン種乳牛の体表面積換算 GFR 値 (平均値範囲 : 229 - 231 mL/min/m²) と肉用牛の体表面積換算 GFR 値 (174 - 177 mL/min/m²) の間には明確な差が認められた。なお、体重換算 GFR 値においても、これらのデータと同様な結果であった。

3-4 統合式による GFR と BUN あるいは血清 creatinine 濃度の相関性

健康な肉用牛の GFR 背景値 (平均 GFR : 175 mL/min/m²) から 70%程度低下すると、血清 creatinine 濃度の上昇傾向がみられた (Fig. 16B)。一方、BUN はバラ

ツキが多く、明確な相関性はみられなかった (Fig. 16A)。

4 考察

Jacobsson の式は、元来ヒトの蓄積 GFR データを基に作成された予測式 (prediction equation) であり、多くの仮説が含まれているが、本法を基にした 1 回採血法は、ラット [29] やネコ [31] において、既に研究や臨床現場で応用されている。一方、第 1, 2 章の研究で、健康牛の GFR 背景値には、品種差がみられるものの、頻回採血法による全身クリアランス法では、同一の用法用量 (iodixanol 投与量 : 10 mg I/kg, 採血時間 : 60, 90 および 120 分) で GFR を測定できることが明らかとなっている。本章では、第 1 と 2 章で供試した牛および新たに追加した牛からなるホルスタイン種乳牛と肉用牛の計 177 頭の頻回採血法からの蓄積 GFR データを Jacobsson の式に代入し、 $\text{estimated Vd} = 335.46e^{-0.054Ct}$ を求め、新たな統合式 (60 分後 1 回採血) を作出した。その後、得られた GFR 値を頻回採血法とホルスタイン種 1 回採血式からの値の同一性を調べ、Jacobsson の式の普遍性 (妥当性) を検証した。

統合式での estimated Vd 値は、腎機能低下牛 (平均値 : 35 mL/kg) では健康牛 (143 mL/kg) に比べ明らかに低値を示したが、第 1 と 2 章でも論述したとおり、腎機能低下牛での iodixanol は、血中に留まり他組織に移行・蓄積することなく、徐々に尿中に排泄されると考えられた。なお、血清中に iodixanol は、腎機能低下牛においても検査の翌日には検知されず、この仮説を裏付けるものであった。

統合式と頻回採血法で求めた GFR の間には、Deming 直線回帰分析で良好な相関性 ($r = 0.93$, $P < 0.001$) がみられ、Bland-Altman 解析においても、95%信頼限界内に約 96% (170/177 頭) が存在していた。このことから、統合式は、頻回採血法に代り利用できると考えられたが、7 頭の逸脱動物の原因については、明確にできなかった。

GFR 背景値に関し、同一体重および同年齢範囲の健康なホルスタイン種乳牛と肉用牛の GFR 背景値を、頻回採血法、ホルスタイン種 1 回採血式と統合式で比較したが、3 法間で差異はみられず、全て同一の値が得られた (Table 5)。一方、ホルスタイン種乳牛 (平均 230 mL/min/m²) と肉用牛 (平均 175 mL/min/m²) 間では、GFR 値に明確な品種差が再確認され、第 2 章のデータを裏付けるものであった。したがって、統合式はホルスタイン種乳牛と肉用牛に共通して使用できると考えられたが、前章で述べたごとく品種差については、飼育方法や地域を含め今後更なる検討が必要と思われた。

統合式で求めた GFR 値と血清 creatinine 濃度との間に、古典的“ドグマ”を証明するものであったが、GFR 値と BUN との関係は不明瞭であった。これには、creatinine は腎尿細管からごく一部が分泌されるに過ぎないが、BUN は尿細管から再吸収されるという体内挙動の違いが関与していると考えられた [49]。このことから、統合式で求めた GFR 値は、腎障害を早期に把握する指標と残存予備能の指標に成り得ることが確認された。Katayama ら [31] は、健康および慢性腎臓病 (International Renal Interest Society 分類のステージ 1 - 4) のネコを用いて、iodixanol と inulin を tracer とし、Jacobsson の式と組み合わせて、1 回採血法の式をそれぞれ作出した。その後、同一ネコに両 tracer を同時投与して、1 回採血法で各 GFR 値を求め比較したところ、同一の GFR 値が得られたと報告している。これらネコの成績とウシのデータを考え合わせると、Jacobsson の式には、多くの仮説 (例えば、定数 0.0016) があるものの、動物種に係わりなく GFR 測定に応用できると考えられた。

ウシ獣医療において、統合式を利用した GFR の測定は、生体に対し採血によるストレスを最小限に留め、また、tracer の残存性もほぼ無視できることから、これまで経験、感性と定型的検査に頼ってきた現状を大きく変える可能性がある。例えば、肉用牛における尿石症の早期発見スクリーニングや、GFR の低下が 1α,25

- (OH)₂ ビタミン D₃ 生成に影響し、産後の乳熱あるいは低カルシウム血症発症の誘発因子になること、あるいは“dietary cation-anion balance” [14] のような腎臓のホメオスターシスに関与する可能性が推測され、今後臨床現場での GFR の応用が期待される。

小括

ホルスタイン種乳牛と肉用牛の頻回採血法の蓄積データから統合式(1回採血法)を作出した。統合式の GFR 背景値を頻回採血法とホルスタイン種 1 回採血式で比較したところ、3 法間で同一の GFR 値が得られた。また、品種差についても再確認できた。さらに、統合式から求めた GFR 値が 70% 程度低下すると、血清 creatinine 値が上昇することも確認した。以上より、GFR 測定における、ウシおよび他動物種のデータより Jacobsson の式 [23] の予測式としての妥当性が証明できたと考える。

Table 5. Comparison of GFR values obtained from three procedures in clinically healthy non-pregnant and non-lactating Holstein dairy and JB beef cows weighing 200 to 900 kg, aged 0.6 to 8 years old

Strains	Procedures	n	Sex	GFR values	
				BSA (mL/min/m ²)	BW (mL/min/kg)
Holstein dairy cows	Multisample method	99	Female	231.4 ± 57.1	2.67 ± 0.86
	Holstein's equation			231.8 ± 54.0	2.68 ± 0.93
	Intergrated formula			229.4 ± 52.0	2.62 ± 0.82
JB beef cows	Multisample method	63	Female	174.2 ± 64.5	2.24 ± 1.07
	Holstein's equation			176.5 ± 55.4	2.29 ± 1.02
	Intergrated formula			173.3 ± 59.5	2.23 ± 1.04

48

The GFR in the multisample method was calculated from serum concentrations 60, 90, and 120 min after iodixanol injection in the respective strains.

The GFR in the Holstein's equation was calculated from a single blood sample based on the cumulative data of Holstein dairy cows by the multisample method using iodixanol.

The GFR in the integrated formula was calculated from a single blood sample based on the cumulative data of both strains by the multisample method using iodixanol.

BSA, body surface area; BW: body weight. Values represent the mean ± SD.

JB: Japanese Black breed

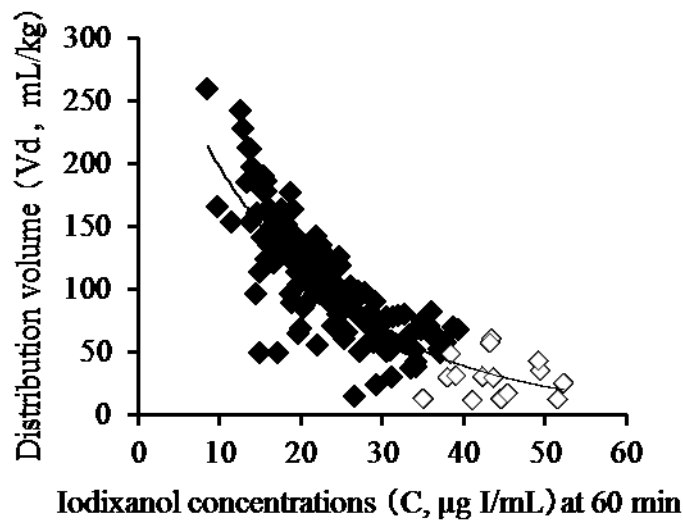


Fig. 14. Scatter plot showing relations of estimated distribution volumes (Vd) and serum iodixanol concentrations (C) at 60 min after iodixanol injection in healthy Holstein dairy and beef cows (◆) and cows with naturally-reduced renal function (◇). n = 177. Estimated $Vd = 335.46e^{-0.054C}$, $r = 0.81$ ($p < 0.01$).

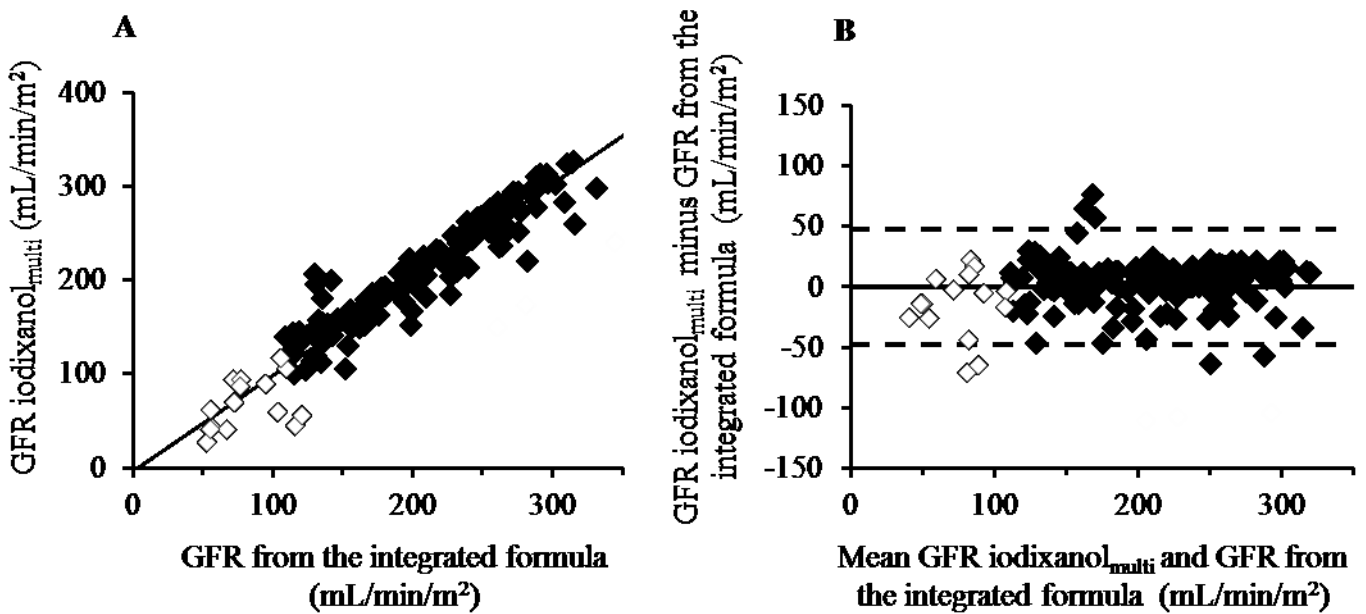


Fig. 15. Relations of GFR values estimated by the multisample method (GFR iodixanol_{multi}) and the integrated formula (GFR from the integrated formula) using iodixanol in healthy Holstein dairy and beef cows (◆) and cows with naturally-reduced renal function (◇). n = 177. (A) Scatter plot of GFR values between both methods by Deming's regression. $Y = 1.02x - 4.03$, $r = 0.93$ ($P < 0.001$); (B) Bland-Altman plot of differences between 2 methods. Mean bias (solid line): 0.32. Upper and lower values indicate 95% limits of agreement: mean bias ± 48.1 (dotted lines).

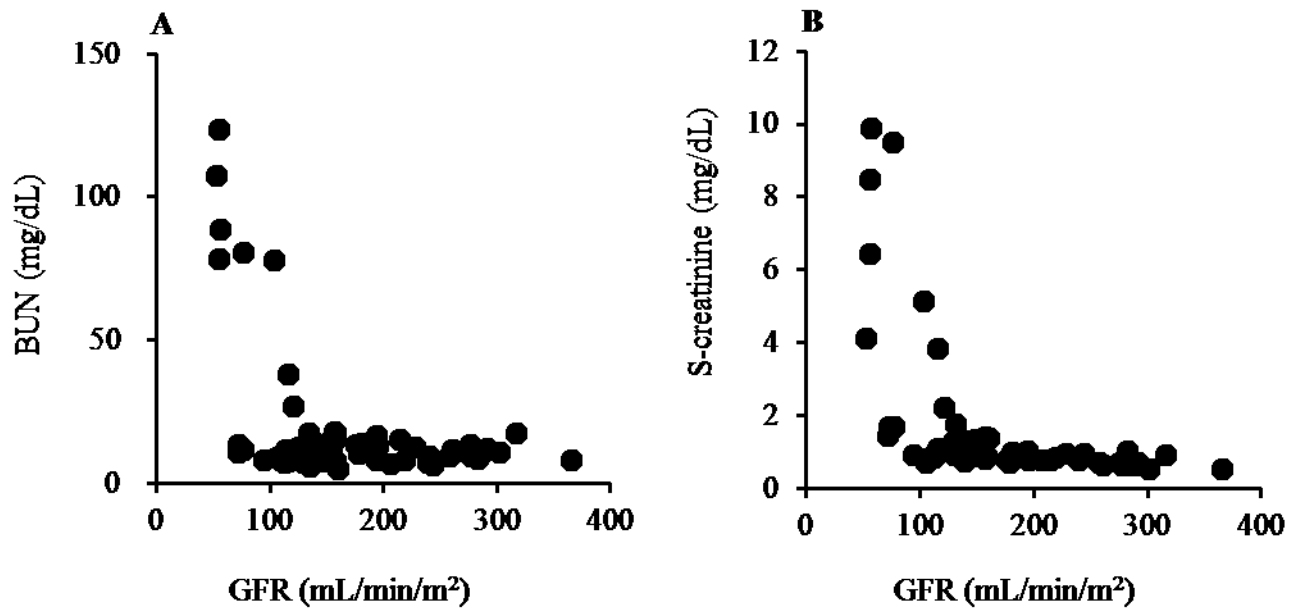


Fig. 16. Relations of GFR values estimated by the integrated formula and BUN (A) or creatinine (B) in healthy beef cows and cows with naturally-reduced renal function. n = 72.

総括

ウシでは、腎臓疾患時の残存予備能や予後判定に関する報告がほとんどなく、臨床現場では、定型的な腎機能検査が行われているに過ぎない。一方、ヒトでは慢性腎疾患の“gold standard”として腎糸球体濾過量（GFR）の測定が行われている。本研究では、ウシにおいて、簡便な GFR 測定法を確立することを目的に、GFR に関与する諸因子の影響を基礎的に調べるとともに、臨床現場で応用可能な 1 回採血法の式の作出を試み、以下の成績を得た。

GFR 測定の tracer としては、微量測定が可能で、inulin とほぼ同等の物理化学的性状を有すると考えられる iodixanol を取り上げた。

第 1 章では、まず、健康なホルスタイン種乳牛を用いた頻回採血法による GFR 測定において、iodixanol の投与量を 10 mg I/kg、採血時間を投与 60, 90 および 120 分に、一方、inulin の投与量は 30 mg/kg、採血時間は、投与 30, 60 および 90 分に設定した。両剤を同一牛に同時投与し、全身クリアランスで GFR 値を求め比較したところ、同一の値が得られた。次いで、GFR 値に及ぼす体重、加齢、産次数および泌乳量の影響を調べたが、GFR 値に変動は見られなかった。その後、健康牛と腎機能低下牛を用いて、頻回採血法での GFR 値、採血時間、分布容積および血清 iodixanol 濃度と Jacobsson の 1 回採血法の式 [23] を応用して、iodixanol 単回静注・1 回採血法で GFR を求める新たな式を作出し、至適採血時間は投与 60 分後、estimated Vd 値は $381.76e^{-0.058Ct}$ に設定した。頻回採血法と 1 回採血法から求めた GFR 値の間には高い同一性がみられ、健常背景値も既知報告とよく一致していた。なお、iodixanol の乳汁への移行性や枝肉への残留性は無視できると思われた。これらの結果より、1 回採血法（以下、ホルスタイン種 1 回採血式）は臨床応用が可能と考えられた。

第 2 章では、黒毛和種肉用牛を用いた。第 1 章の結果を基に、iodixanol の投与量 (10 mg I/kg) と採血時間 (60, 90 および 120 分後)、inulin の投与量 (30 mg/kg)

と採血時間（30, 60 および 90 分後）を設定した。両剤を同一牛に同時投与し，頻回採血法で GFR 値を求め，同等性を確認した。その後，GFR 値に及ぼす体重，加齢および産次数の影響を調べたが，GFR に変動は見られなかった。次に，健康牛と腎機能低下牛を用いて，頻回採血法で求めた GFR 値と第 1 章で作出したホルスタイン種 1 回採血式を用いて得られた GFR 値を比較したところ，ホルスタイン種 1 回採血式は，黒毛和種肉用牛にも共通して適用できることが判明した。したがって，ホルスタイン種 1 回採血式は，黒毛和種肉用牛の GFR 測定にも利用できると判断した。

第 3 章では，Jacobsson の式の妥当性を検証するために，第 1 - 2 章で得られたデータを基にホルスタイン種乳牛と黒毛和種肉用牛の両品種に共通して使用出来る 1 回採血統合式（以下，統合式）の確立を試みた。その結果，新たに作成した統合式より求めた GFR 値，第 1 - 2 章における頻回採血法とホルスタイン種 1 回採血式で得られた各 GFR 値には，3 法間で同一の値が得られることを確認した。また GFR 値には，品種差があることを再確認した。統合式から求めた GFR 値が 70%程度低下すると，血清 creatinine 値が上昇することも確認した。したがって，統合式は，ホルスタイン種乳牛と黒毛和種肉用牛の GFR 測定に共通して利用できると考えられ，Jacobsson の式の妥当性も証明できた。

以上，本研究では，ウシにおいて初めて GFR 測定法を確立し，その健康背景値（統合式での GFR 背景値，ホルスタイン種: 229.4 ± 52.0 mL/min/m², n = 91, 黒毛和種: 173.3 ± 59.5 mL/min/m², n = 63), 体重，加齢，産次数，泌乳量の影響あるいは品種差について明らかにした。また，Jacobsson の式と iodixanol を用いた 1 回採血法は，GFR 測定の簡便法として，臨床学的，臨床薬理的および薬物動態学的研究に利用できると考えられた。BUN および血清 creatinine が正常値であり，GFR 値のみが低下するような早期腎機能低下の臨床意義は肥育牛に対し利用できると考えられたが，今後，その詳細については検討する必要がある。結論として，

1 回採血法による GFR 測定は，獣医臨床および研究両面において有用な手法となり，腎臓の残存予備能や予後判定に利用できると考えられた。

謝辞

稿を終えるに当たり、本研究の遂行に際し、懇切丁寧なるご指導とご鞭撻を賜りました岩手大学 共同獣医学科比較薬理毒性学研究室 古濱 和久教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を開始するに当たり、紹介の労を取って頂き、かつ論文作成に際しては有益なご助言とご校閲を頂きました岩手大学 共同獣医学科産業動物内科学研究室 佐藤 繁教授に深謝します。また、本稿作成に際し、ご指導とご助言を賜りました帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門予防獣医療学分野 猪熊 壽教授、東京農工大学 共同獣医学科獣医薬理学講座 下田 実教授および岐阜大学 共同獣医学科臨床獣医学講座 鬼頭 克也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するに当たり、サンプル測定にご協力して頂いた岩手大学 獣医学課程獣医薬理学教室 宮野 安奈さんをはじめ、研究室学生各位に感謝します。

貴重な財産であるウシを提供して頂いた佐藤 護氏、大木 伸一氏、半沢 一良氏、長谷部 裕行氏、丹野 秀幸氏、斉藤 孝司氏、大内 重夫氏をはじめ、ご尽力頂いた農場の方々にお礼申し上げます。最後に、私の家族の協力を深く感謝します。

引用文献

1. Anderson, R. R. and Mixner, J. P. (1960). Inulin renal clearance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 43: 1476-1479.
2. Aspelin, P., Aubry, P., Frasson, S. G., Strasser, R., Willenbrock, R. and Berg, K. J. (2003). Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N. Engl. J. Med.* 348: 491-499.
3. Bauer, J. H., Brooks, C. S. and Burch, R. N. (1982). Clinical appraisal of creatinine clearance as a measurement of glomerular filtration rate. *Am. J. Kidney Dis.* 2: 337-346.
4. Bland, J. M. and Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1: 307-310.
5. Bland, J. M. and Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8: 135-160.
6. Brown, S. A., Finco, D. R., Boudinot, F. D., Wright, J., Taver, S. L. and 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. Bröchner-Mortensen, J. (1972). A simple method for the determination of glomerular filtration rate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 30: 271-274.
8. Darling, I. M. and Morris, M. E. (1991). Evaluation of “true” creatinine clearance in rats reveals extensive renal secretion. *Pharm. Res.* 8: 1318-1322.
9. Deming, W. E. (1964). *Statistical adjustment of data*, 1st ed., Dover Publication Inc., Mineola, New York.
10. Dittmer, D. (1961). *Blood and Other Body Fluids*, Fedderation of American Societies for Experimental Biology, Literary Licensing LLC, Washington, DC.
11. Finco, D. R., Brown, S. A., Crowell, W. A. and Barsanti, J. A. (1991). Exogenous

creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1029-1032.

12. Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982). *Pharmacokinetics*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, NY.
13. Gilman, A., Philips, F. S. and Koelle, E. S. (1946). The renal clearance of thiosulfate with observations on its volume distribution. *Am. J. Physiol.* 146: 348-357.
14. Goff, J. P. and Horst, R. L. (2003). Milk fever control in the United States. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* 97: 145-147.
15. Groth, S. and Asasted, M. (1981). ⁵¹Cr-EDTA clearance determined by one plasma sample. *Clin. Physiol.* 1: 417-425.
16. Heglund, I. F., Michelet, A. A., Blazak, W. F., Furuham, K. and Holtz, E. (1995). Preclinical pharmacokinetics and general toxicity of iodixanol. *Acta. Radiol. Suppl.* 399: 69-82.
17. Hirano, T., Kobayashi, N., Itoh, T., Takasuga, A., Nakamura, T., Hirotsune, S. and Sugimoto, Y. (2000). Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome. Res.* 10: 659-663.
18. Holt, J.P., Rhode, E. A. and Kines, H. (1968). Ventricular volumes and body weight in mammals. *Am. J. Physiol.* 215: 704-715.
19. Imai, E., Horio, M., Nitta, K., Yamagata, K., Iseki, K., Hata, S., Ura, N., Kiyohara, Y., Hirakata, H., Watanabe, T., Moriyama, T., Ando, Y., Inaguma, D., Narita, I., Iso, H., Wakai, K., Yasuda, Y., Tsukamoto, Y., Ito, S., Makino, H., Hishida, A. and Matsuo, S. (2007). Estimation of glomerular filtration rate by the MDRD study equation modified for Japanese patients with chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 11: 41-50.
20. Imai, K., Yamagishi, N., Kim, D., Devkota, B., Sato, S., Murayama, I. and Furuham, K.

- K. (2011). Serum clearance of iodixanol for estimating glomerular filtration rate in calves. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 1625-1628.
21. Imai, K., Yamagishi, N., Okura, N., Fukuda, T., Hirata, T., Okada, K., Sato, S. and Furuhashi, K. (2012). Estimation of glomerular filtration rate in calves using the contrast medium iodixanol. *Vet. J.* 193: 174-179.
22. Jacobsen, P. B., Blindheim, L. and Skotland, T. (1995). Bioanalytical methods for iodixanol and their application to studies on metabolism and protein binding. *Acta. Radiol. Suppl.* 399: 61-66.
23. Jacobsson, L. (1983). A method for the calculation of renal clearance based on a single plasma sample. *Clin. Physiol.* 3: 297-305.
24. Japanese Association for Laboratory Animal Science. (1987). Guidelines for animal experimentation. *Exp. Anim.* 3: 285-288.
25. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare Notification No. 498, (2006).
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/> (Accessed 29, November 2005)
26. Kahle, von W., Leonhardt, H. und Platzer, W. (1979). Taschenatlas der Anatomie für Studium und Praxis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Deutsch.
27. Karisberg, R. P., Dohad, S. Y. and Sheng, R. (2010). Contrast-induced acute kidney injury (CI-AKI) following intra-arterial administration of iodinated contrast media. *J. Nephrol.* 23: 658-666.
28. Katayama, R., Saito, J., Katayama, M., Yamagishi, N., Yamashita, T., Kato, M. and Furuhashi, K. (2012). Simplified procedure for the estimation of glomerular filtration rate following intravenous administration of iodixanol in cats. *Am. J. Vet. Res.* 73: 1344-1349.
29. Katayama, R., Yamaguchi, N., Yamashita, T., Watanabe, S., Satoh, H., Yamagishi, N.

- and Furuham, K. (2010). Calculation of glomerular filtration rate in conscious rats by the use of a bolus injection of iodixanol and a single blood sample. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 61: 59-64.
30. Katayama, R., Watanabe, K., Yamagishi, N., Abe, S., Satoh, H. and Furuham, K. (2011). Sequential measurements of glomerular filtration rate in conscious rats by a bolus injection of iodixanol and a single blood samples. *J. Appl. Toxicol.* 31: 360-365.
31. Katayama, M., Sasaki, A., Takayasu, M., Shimamura, S., Uzuka, Y., Murayama, I., Satoh, H. and Furuham, K. (2013). Application of the single blood sample method to estimate feline glomerular filtration rate in a clinically relevant situation. *J. Feline Med. Surg.* (PMID: 23735674).
32. Kishimoto, M., Yamada, K., Tsuneda, R., Shimizu, J., Iwasaki, T., and Miyake, Y. (2008). Effect of contrast media formulation on computed tomography angiographic contrast enhancement. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 49: 233-237.
33. Kishimoto, M., Yamada, K., Watanabe, A., Miyamoto, K., Iwasaki, T. and Miyake, Y. (2007). Comparison of excretory urographic contrast effects of dimeric and monomeric non-ionic iodinated contrast media in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 713-715.
34. Klaus-Dieter, B. and Robert, E. H. (2005). *Bovine Anatomy An Illustrated Text.*
35. McCullough, P. A., Bertrand, M. E., Brinker, J. A. and Stacul, F. (2006). A meta-analysis of the renal safety of isomolar iodixanol compared with low-osmolar contrast media. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 692-699.
36. Mercer, H. D., Willett, L. B., Schandbacher, F. L., Moorhead, P. D. and Powers. T. E. (1978). Use of the double-isotope, single-injection method for estimating renal function in normal and polybrominated biphenyl-exposed dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1262-1268.
37. Michigoshi, Y., Katayama, R., Yamagishi, N., Kato, M., Saito, J., Satoh, H. and

- Furuhama, K. (2012). Estimation of glomerular filtration rate in rabbits by a single-sample method using iodixanol. *Lab. Anim.* 46: 341-344.
38. Miyagawa, Y., Takemura, N. and Hirose, H. (2010). Evaluation of a single sampling method for estimation of plasma iohexol clearance in dogs and cats with various kidney functions. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 271-278.
39. Miyamoto, K. (1998). Evaluation of single –injection method of inulin and creatinine as a renal function test in normal cats. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 327-332.
40. Miyamoto, K. (2001). Clinical application of plasma clearance of iohexol on feline patients. *J. Feline Med. Surg.* 3: 143-147.
41. Miyamoto, K. (2001). Use of plasma clearance of iohexol for estimating glomerular filtration rate in cats. *Am. J. Vet. Res.* 62: 572-575.
42. Moe, L., and Heiene, R. (1995). Estimation of glomerular filtration rate in dogs with ^{99m}Tc-DTPA and iohexol. *Res. Vet. Sci.* 58: 138-143.
43. Newman, E.V., Gilman, A. and Philips, F.S. (1946). The renal clearance of thiosulfate in man. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 79: 229-242.
44. Rosenberger, G. (1989). *Clinical Examination of Cattle.*
45. Sato, R. (1991). Comparative studies on the validity of renal function tests in the experimentally-induced bovine glomerulonephritis. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 307-15.
46. Shingu, H., Hodate, K., Kushibiki, S., Ueda, Y., Watanabe, A., Shinoda, M. and Matsumoto, M. (2001). Profiles of growth hormone and insulin secretion, and glucose response to insulin in growing Japanese Black heifers (beef type): comparison with Holstein heifers (dairy type). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 130: 259-270.
47. Skotnicka, E., Muszczyński, Z., Dudzinska, W. and Suska, M. (2007). A review of the renal system and diurnal variations of renal activity in livestock. *Irish Vet. J.* 60:

161-168.

48. Smale, S. (1985). On the efficiency of algorithms of analysis. *Bull. Am. Math. Soc.* 13: 87-121.
49. Smith, H. W. (1951). *The Kidney, Structure and function in health and disease.* Oxford University Press, New York.
50. Svaland, M. G., Haider, T., Langseth-Manrique, K., Andrew, E. and Hals, P. A. (1992). Human pharmacokinetics of iodixanol. *Invest. Radiol.* 27: 130-133.
51. Swenson, Melvin J. (1990). *Dukes' physiology of domestic animals.* Cornell University Press, London. United Kingdom.
52. Varona, J. L. (2002). Graphic and numerical comparison between iterative methods. *Math. Intell.* 24: 37-46.
53. Von Hendy-Willson, V. E. and Pressler, B. M. (2011). An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Vet. J.* 188: 156-165.
54. Wanner, M., Ziv, G., Nicolet, J., Noelpp, U. P. and Roesler, H. (1981). Experiments with the double isotope single-injection method for determining glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in veal calves. *Res. Vet. Sci.* 30: 239-240.

Basic Studies on Estimation of Glomerular Filtration Rate in Cattle

MURAYAMA, Isao

Although glomerular filtration rate (GFR) is a most acceptable index for kidney function assessment in humans, there are methodological difficulties with its application in bovine practice. For example, the classic urinary inulin clearance corresponding to GFR is labor intensive and time consuming because it requires accurately timed blood and urine collection. Moreover, inulin has an intrinsic disadvantage that requires boiling immediately before use, owing to its extremely low solubility. Therefore, only a few studies have reported bovine GFR measurements to date. The objective of the present study was to establish the simplified procedure to estimate GFR in cattle using the isotonic non-ionic dimeric contrast medium iodixanol as a test tracer. Iodixanol is rapidly excreted into urine without metabolic degradation, and no or a very little protein binding with very short half-life.

In chapter 1, the study was designed to develop a single-blood-sample method for estimating the GFR in Holstein dairy cattle. First, iodixanol and the standard GFR tracer inulin were coadministered as a bolus intravenous injection to clinically healthy cattle at 10 mg I/kg and 30 mg/kg, respectively, followed by blood collection for multisample strategies. The GFR values estimated by iodixanol were well consistent with those by inulin. Neither effect of body weight gain, age, nor parity on the GFR estimates was noted with the protocol used. No difference was observed between the GFR values obtained from non-lactating and lactating cattle, presumably suggesting that no transfer of iodixanol to milk occurred. Jacobsson's formula for calculating the GFR in the single-blood-sample

method was derived from the injected dose, sampling time, serum concentration, and estimated volume of distribution based on the data from the multisample method in clinically healthy cattle and cattle with reduced renal function. The GFR values estimated by the single-blood-sample-method were correlated with those calculated by the multisample method. These results demonstrate that the single-blood-sample method using iodixanol (Holstein equation) can apply as a screening for the GFR estimates in dairy cattle.

In chapter 2, the study was carried out to clarify whether Holstein equation based on the single-blood-sample-method in Holstein dairy cattle as described in chapter 1 can apply to the GFR estimates for Japanese Black cattle (beef cattle). Iodixanol and inulin were coadministered intravenously to identical cattle at doses of 10 mg I/kg and 30 mg/kg, respectively, and the GFR was determined by the conventional multisample method. The GFR values from iodixanol were consistent with those from inulin, and no effect of body weight, age, or parity on GFR estimates was noted. However, the GFR in cattle weighing less than 300 kg, aged less than 1 year old, largely fluctuated, presumably due to the rapid ruminal growth and dynamic changes in renal function at young adult ages. Using clinically healthy cattle and those with reduced renal function, the GFR values estimated from Holstein equation were in good agreement with those by the multisample method using iodixanol ($r = 0.89$, $P < 0.01$). The results indicate that Holstein equation can be used for the GFR estimate of beef cattle in the same dose regimen as Holstein dairy cattle, and provides a practical and ethical alternative.

In chapter 3, a newly integrated formula, which can apply to both dairy and beef cattle, was developed. Using clinically healthy dairy and beef cattle and cattle with reduced renal function, the GFR values estimated from the integrated formula were compatible with those calculated by the multisample method. The basal reference GFR values were also

equal among the three procedures; namely, the integrated formula, Holstein equation prepared by a single blood sample in Holstein dairy cattle, and the multisample method. The results suggest that the integrated formula based on Jacobsson's formula using iodixanol can be used for the GFR estimates in cattle of either strain.

In conclusion, the validity for the application of Jacobsson's formula (definition) to estimate the bovine GFR was proven, and the integrated formula would be used extensively as an alternative tool in a clinically relevant situation.