

ネコの慢性腎臓病に対するベラプロスト
ナトリウムの治療効果に関する研究

2019年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科

竹中雅彦

ネコの慢性腎臓病に対するベラプロスト
ナトリウムの治療効果に関する研究

竹 中 雅 彦

目次

第Ⅰ章 緒言	1
第Ⅱ章 部分的片側尿管閉塞 (partial unilateral ureteral obstruction:PUU0)	
・解除ラットモデルにおけるベラプロストナトリウムの効果	6
1. 序文	7
2. 材料および方法	10
3. 成績	14
4. 考察	20
5. 小括	24
第Ⅲ章 健常ネコにおけるベラプロストナトリウムの安全性評価	25
1. 序文	26
2. 材料および方法	28
3. 成績	35
4. 考察	47
5. 小括	53
第Ⅳ章 慢性腎臓病ネコに対するベラプロストナトリウムの予備的研究	
.....	55
1. 序文	56
2. 材料および方法	57
3. 成績	65
4. 考察	73
5. 小括	79
第Ⅴ章 慢性腎臓病ネコにおけるベラプロストナトリウムの臨床効果の 検討	81

1. 序文	82
2. 材料および方法	84
3. 成績	91
4. 考察	107
5. 小括	113
第VI章 総括	116
謝辞	122
引用文献	123

第 I 章

緒 言

腎不全とは腎臓または腎臓以外の臓器障害により、腎機能および排泄機能が障害された状態である。慢性腎臓病は、その腎不全を引き起こす病気そのものを指しており、腎機能が慢性的に障害され進行性かつ不可逆的な機能障害をもたらす病態である。

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、病因別では原発性、二次性（糖尿病、膠原病、遺伝性）などに分類される。一方、病名においては、同じ病態の腎臓病に対して、病理学的診断名あるいは病因による診断名が混在する。そのため臨床診療の場において混乱が生じていることから、統一した腎臓障害の名称が考えられた。人医界では、腎臓障害の初期段階から透析に至る末期の段階まで、慢性に経過する腎臓障害を包括する概念として、慢性腎臓病（Chronic kidney disease:CKD）という用語が提示された。

ヒトのCKDの定義として、(1) 腎臓障害の存在（尿異常や画像診断の異常を含む）、(2) 腎臓機能の中程度以上の低下（ $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ ）のいずれか、もしくはその両方が3カ月以上持続して存在することである[57]。獣医学領域では、上記の定義に準じてイヌとネコのCKDの病期が定義されているが、腎臓機能の項目は、GFR（Glomerular filtration rate）そのものではなく、血漿クレアチニン濃度による分類が International Renal Interest Society（IRIS）から提唱されている[25]。

ネコのCKDは、Lulichらの報告では15歳以上のネコにおける疾患の31%を占め発症から数年で尿毒症を引き起こして、死に至るとされている[42, 73]。ヒトのCKDの主な病因は、糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、糸球体硬化症などであるが、いずれの病態も糸球体過剰濾過と持続性尿蛋白質が特徴である。この二つの要因は、尿細管間質の線維化を促進させ腎機能を低下させる。治療薬としてアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）とアン

ジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）が主に用いられる。ACEI と ARB の薬理作用は、糸球体の輸出細動脈を選択的に拡張させることで、糸球体内圧を低下させ過剰濾過と尿蛋白質の漏出を軽減させる。

このようにヒトの CKD における ACEI と ARB の使用は、CKD の病態進行の阻止を狙う上で理にかなう選択と言える。一方、ネコの CKD の主たる病因は、尿細管間質性腎炎である [7, 13] が、病態はいまだ十分には解明されておらず臨床症状もヒトと大きな相違点がある。ヒトの CKD では糸球体障害による持続的な尿蛋白質と尿量減少、それらに伴う浮腫が特徴である。一方、ネコの CKD の大部分では尿蛋白質が見られず、CKD の進行と並行して多尿と脱水が顕著となる。このような臨床的症状の相違は、根底にある病態が異なることに起因すると考えられる。

ネコの CKD に対する主な治療薬としては、腸管内で尿毒症物質を吸着させる経口吸着剤（薬用活性炭） [59] や、ACEI [32]、ARB [77] などが使用されている。しかしながらネコの CKD においてこれらの薬剤の有効性は十分とはいえない。前述のようにヒトの CKD の病態は糸球体障害に起因している。一方、ネコの CKD の病態は尿細管間質障害によるものである [7, 13]。このような理由から、ネコの CKD に対する治療法において、ヒトと病態が異なるのにもかかわらず、同様の治療法でもよいのかという疑問が提起される。CKD が進行し重度の尿毒症に至ったネコの治療には、ヒトと同様に血液透析 [12] や腎臓移植 [39] が適応可能であるが、技術的煩雑さや倫理的な問題のため、獣医臨床分野では普及には残念ながら至っていない [11]。そのため、最終ステージへと病態が進行しないように、低蛋白食事療法や輸液療法が実施されているが満足する結果に至っていない。そのため、CKD ネコの病因である尿細管間質性腎炎に対する有効な薬物療法が切望されている。

プロスタサイクリン (Prostacyclin: PGI₂) は Vane らによって発見された生体内物質である[48]。PGI₂は、主に血管内皮細胞で産生され、生体内でアラキドン酸カスケードを介して作用を発揮することになる。PGI₂は、強力な抗血小板作用に加え、内皮細胞保護作用、血管拡張作用、さらには炎症性サイトカイン抑制作用を有しており、臓器の血流の保持に極めて重要な役割を果たしている[48, 54, 104]。ヒトにおいては、その薬理作用を利用して動脈硬化症、末梢血管疾患の治療薬として期待された。しかし、その半減期は3~5分と極めて短く、不安定な物質であるため臨床応用は限定的であった。近年、安定型プロスタサイクリン誘導体ベラプロストナトリウムが開発された。ベラプロストナトリウム (Beraprost sodium: BPS) は、経口投与可能なプロスタサイクリンの誘導体であり、半減期が PGI₂と比較して約 2 時間と長く、化学的に安定しているのが特徴である。BPS はプロスタサイクリンと同様の生理活性を持ちヒトの末梢動脈閉塞症や肺高血圧症の治療薬として、我が国をはじめアジア各国で長年にわたって臨床使用されている[10, 21, 20, 37, 41, 43, 61]。また腎泌尿器分野では、各種の腎臓病に対する効果が検討され、その有用性がラットやマウスなどの各種腎臓病モデル動物[3, 82, 94, 99, 104]あるいはヒトにおいて報告[18]されている。一方、現在のところネコの腎臓病に対する BPS 投与に関する報告例はない。BPS の薬理作用および BPS を用いた各種腎臓病モデル動物における有効性を示す報告から、BPS が CKD ネコに対して有効な治療薬になり得る可能性が考えられる。そのため、本研究は、CKD ネコに対する BPS の有効性と、安全性および臨床応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

まず第Ⅱ章では、成体ラットを用いて、CKD ネコの病因である尿細管間質性腎炎のモデルを作成して、BPS の有効性を検討した。モデルには新たに考案した部分的片側尿管閉塞法 (Partial unilateral ureteral obstruction:PUUO)を用いた。

プロスタグランジン系薬剤に対する感受性は動物種によって大きく異なる。そのため、自然発症したCKD ネコにBPS を適応するにあたっては、ネコに対するBPS の安全性データの取得が不可欠であるが、未だその報告はない。そこで第Ⅲ章ではネコにBPS を投与した際に生じる副作用や有害事項の種類と程度を、健常ネコを用いて検討した。ネコへのBPS 投与量は、ラット、イヌおよびヒトでの安全性試験および薬理作用（血小板凝集）の成績を参考にして設定した。

次に第Ⅳ章では自然発症CKD ネコに対するBPS 投与の予備的研究として、CKD ネコに対するBPS の腎臓機能への有効性と尿毒症に対する、BPS の有効性と安全性を検討した。

そして、第Ⅱ章から第Ⅳ章までの結果を基に、第Ⅴ章ではBPS を臨床応用することを目的として自然発症CKD ネコに対してプラセボを対象とするランダム化二重盲検比較試験を実施しBPS の有効性および安全性を評価した。

第 II 章

部分的片側尿管閉塞・解除ラットモデル
におけるベラプロストナトリウムの効果

序 文

慢性腎臓病（CKD）は進行性で不可逆的に腎臓機能を低下させることが知られている。腎臓機能を低下させる要因として、糸球体障害よりも尿細管間質障害が、腎臓機能低下とより密接に関係することがヒトと動物で報告され [55]、尿細管間質の低酸素障害が慢性腎臓病の最終共通経路（Final common pathway）として重要であると考えられるようになった [52]。また CKD ネコの主な病因は尿細管間質性腎炎であり、病態である尿細管間質線維化の進行が腎臓機能低下の要因となっている。そのためヒトやネコにおいても尿細管間質障害の進行のメカニズムを解明するために様々な慢性腎臓病動物を用いた研究が、積極的に検討されている [6, 77, 83]。

ベラプロストナトリウム（BPS）を CKD ネコに臨床応用するにあたり、CKD ネコに対する BPS の病理組織学的効果および臨床的効果を評価する必要がある。様々な動物モデルを用いた病理組織学的研究報告では、いずれも末期的な CKD の病理組織病変による評価であり、実際の臨床において遭遇する初期段階での病理組織病変の評価ではない。

片側尿管閉塞（Unilateral ureteral obstruction: UUO）モデルは、様々な動物で幅広く検討され、尿細管障害と尿細管間質の線維化を引き起こすことが可能で、この両者の共通メカニズムを探すための方法として適している [34]。UUO ラットモデルにおいては、結紮側の腎臓に急速な腎盂領域の拡大と、腎臓実質の著明な菲薄化が生じると共に、腎臓実質において尿細管障害と尿細管間質の線維化が認められる [96]。しかしながら、臨床における尿管閉塞は、ほとんどが不完全閉塞であり、臨床例との解離という課題があった。そのため、腎臓病の進行メカニズムの解明や薬剤の効果をより忠実に再現す

るために部分的片側尿管閉塞 (Partial unilateral ureteral obstruction: PUUO) モデルが開発されてきた [88, 95]。PUUO モデルは, Ulm, A. H. と Miller, F. によってイヌで最初に作成され [91], ラットモデルもこれに準じて作成されている。これは尿管閉塞を生じさせるために, 腸腰筋に設けた溝に尿管の一部を埋め込む方法が採用されている。しかしながら, ラットの年齢や尿管を埋め込む深さ, 閉塞期間により腎臓障害の程度が異なることから, このモデルの是非に関して, 議論の余地がある [95]。

そこでラットの尿管を統一した方法により部分的に結紮し, 尿管の狭窄径を一定に保つことで腎臓障害の程度を均一に, 自然発生 CKD に類似した尿管間質線維化を誘導するモデル作成を考案した。本研究では腎臓の発生や腎臓機能保持に重要な役割をもつプロスタサイクリン (PGI_2) が尿管間質障害に対して抑制効果があるのではないかと注目した。

PGI_2 は, 腎臓において産生される最も重要なアラキドン酸代謝物の一つである [48, 54]。 PGI_2 合成酵素ノックアウトマウスに重大な腎臓障害が認められること [104] から, 内因性の PGI_2 が, 腎臓の発生や腎臓機能保持に重要な役割を担っていることが最近明確になってきた。BPS は, 経口投与可能な PGI_2 の安定した誘導体である。BPS は PGI_2 レセプターを介して作用し, PGI_2 と同様な薬理作用を発現する [58, 78]。すなわちその作用としては, 抗血小板作用 [59], 様々な臓器における血管拡張作用 [1], 平滑筋細胞の成長抑制作用 [24], 血管内皮細胞の保護作用 [29], 炎症性サイトカインの抑制作用 [46] が挙げられる。BPS はヒトでは慢性動脈閉塞症や肺高血圧症の治療, 長期的に腎臓機能が低下した患者の腎血流低下の抑制 [102], あるいは糖尿病性腎症の尿蛋白質増加抑制 [67] などの慢性腎臓病疾患にも用いられている。BPS はラットモデルにおいて糸球体基底膜性腎炎 [38, 106], 糖尿病性腎症 [102], 造影剤腎

症[103], 薬剤誘導性腎障害[44]などに対しての有効性が示されてきた。しかし, いずれも糸球体疾患に対する報告であり BPS の自然発生 CKD に類似した尿細管障害と尿細管間質線維化に対する PUUO モデルでの検討は報告がない。

そこで第 II 章では新たに考案した PUUO ラットモデルを用いて自然発症 CKD ネコに類似した尿細管間質性腎炎を作成し, その後, 閉塞を解除して BPS の尿細管障害と尿細管間質線維化に対する効果を病理組織学的に評価した。

材料および方法

1. 供試動物

8 週齢 Wistar 系の雄性ラット（日本チャールスリバー， 神奈川）18 匹（BW, 240~250 g）を，開腹処置のみ施したシャム群，薬剤を投与しない対照群，BPS 投与群の 6 匹ずつ 3 群に分けた。各群の 6 匹はラット専用のケージ（W345×D403×H177 mm）で 2 匹ずつ飼育し，ラット飼育用の固形飼料（MF 飼料，オリエンタル酵母工業社，東京）を与え，給水ビン（100 cc）にて自由に給水させ，室温を 24 °C に保った。その環境で 1 週間の馴化後，実験に供した。

2. PUU0—再疎通ラットの作成と BPS 投与方法

BPS は TORAY（東レ株式会社，東京）より 50 mg 入手し、マイクロピペット（GILSON MICROMAN，エムエス機器株式会社，東京）を用い注射用水で溶解し経口用に調整した。全ての実験は，東京農工大学の「実験動物の治療と取扱いに関するガイドライン」に従い実施した。

馴化後のラット 18 匹に，プロピオニルプロマジン（コンベレン，バイエル薬品株式会社，大阪）0.5 mg/head, im, 筋注用ケタミン塩酸塩（ケタラール筋注用，第一三共株式会社，東京）2.5 mg/head, im にて前処置後，ハロタン（フローセン，武田薬品工業株式会社，東京）を吸入させ麻酔維持とした。ラット 12 匹は腹部を正中切開し，左尿管を分離させラット尿管径の約 1/2 の太さの 0.5 mm 径サージカルワイヤー（Wire steril USP 2，ポーメル

社，ドイツ）を尿管に並走させ尿管と共に 4-0 のナイロン糸（Nylon steril USP 4/0，ポーマル社，ドイツ）で結紮した。そして，結紮後にサージカルワイヤーを抜去し PUUO を完成させた。結紮処置から 1 週間後に麻酔下にて再度開腹し，尿管結紮を解除した。本群を 2 群に分け，薬剤を投与しない対照群 6 匹と BPS 投与群 6 匹を設定した。そして，ラット 18 匹のうち残りの 6 匹は同様の前処置および麻酔下で尿管結紮の処置をせず開腹のみを実施したシャム群とした。

BPS 群は PUUO を解除した翌日から注射用水に溶解させた BPS 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で 12 時間間隔にてゾンデを使用し，経口的に 3 週間投与した。PUUO 解除から 3 週間後に BPS 群と対照群はプロピオニルプロマジン（コンベレン，バイエル薬品株式会社，大阪）0.5 mg/head，im で前処置を施し，ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル，共立製薬株式会社，東京）（4 mg/kg，im）麻酔下で開腹した。血液はツベルクリン用シリンジで，26G \times 1/2 針を用いて腹部大動脈から採血し，尿は膀胱を直接穿刺して採尿した。その後，後大静脈からペントバルビタールナトリウムを徐々に投与し安楽殺し，直ちに剖検し腎臓を解析のために採取した。シャム群 6 匹は開腹のみ実施して 4 週間後に対照群および BPS 群と同様な方法で麻酔を施し，尿管に狭窄がないことを確認して血液と尿を採取後に同様な方法を用いて安楽殺し，直ちに剖検し腎臓を解析のために採取した。

3. 血液学的検査と尿検査項目の測定方法

全ての群において、サンプルを採取後直ちに血液検査及び尿検査を実施した。血液検査では赤血球数 (RBC), 白血球数 (WBC), 血小板数 (PLT), ヘモグロビン (Hb), 充填赤血球量 (Ht), を自動血球計算機 (セルタック MEK-5258, 日本光電株式会社, 東京) を用いて測定した。また血液化学検査として総蛋白質 (TP, Biuret 法), 総コレステロール (TC, 酵素法), 血清クレアチニン (sCr, 酵素法), 血液尿素窒素 (BUN, ウレアーゼ・GLDH・ICDH・UV 法), ナトリウム (Na), カリウム (K), クロール (Cl) と尿の pH を臨床検査機関 (福山臨床検査センター株式会社, 広島) に依頼して測定した。尿蛋白質は尿検査試験紙 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社, 東京) を用いて 0 (陰性) から + (30 mg/dl 相当), 2+ (100 mg/dl 相当), 3+ (300 mg/dl 相当) によって評価した。

4. 病理組織学的検査

剖検時に摘出した左腎の腎門部領域から腎動静脈の血流方向に並行して 3 mm 厚の輪切り状の組織片を切り出し, メタノール・カルノア液によって浸漬固定した。固定後の組織片は定法に従いパラフィン包埋し, 5 μ m 厚の連続切片を作成した。切片は腎臓障害度を評価するために PAS と HE, シリウスレッドにより染色した。尿細管上皮の好塩基変性や尿細管拡張はシャム群と対照群, BPS 群について半定量的に評価した。方法は光学顕微鏡によって無作為に選択した 20 ヶ所の視野 ($\times 40$) を観察し, 好塩基変性や尿細管拡張が全体で幾つの視野にみられたかにより, 0 から 5+ の変化領域に従い段階分けをした。0 は病変領域なし, 1+ は 10 % 以下, 2+ は 10~25 %, 3+ は 25~50 %, 4+ は 50~75 %, 5+ は 75 % 以上とした。例えば 7 視野にみられた場合は 20

分の7であるから35%で「3+」となる。以下のシャム群，対照群，BPS群の腎臓のシリウスレッド染色切片の線維化領域の定量化は，画像をコンピュータで取り込み実施した。各々の切片に対して5個の強拡大視野（×200倍）を無作為に選択し，正常な染色領域と線維化領域との割合（但し糸球体領域を除く）を画像解析システム（MacSCOPE，version 2.5.5，三谷商事株式会社，東京）で計算した。

5. 統計解析

試験治療を受けた全てのネコを安全性解析の対象（安全性解析対象）に含めた。測定値は、平均±標準誤差で示した。全ての統計処理は、コンピュータ解析ソフトEXSUS(Arm Systems，大阪)を用いた。

血液および尿検査値については，シャム群と対照群をStudentのt検定によって比較することで腎臓障害による影響を検討した。BPSの効果は、対照群とBPS投与群の検査値について，Studentのt検定によって比較した。病理組織については，尿細管上皮変性および尿細管拡張について半定量評価，線維化領域面積について定量評価について，各々の視野の平均値を計算した。シャム群と対照群の比較，対照群とBPS投与群の比較，尿細管上皮の変性および尿細管拡張についてはWilcoxon検定，線維化領域面積についてはWelch検定によっておこなった。p値が0.05未満（あるいは $p < 0.05$ ）の場合を統計学的有意とした。

成 績

1. 血液学的検査と尿検査所見

ラットからの採血は Pre 値の採血が困難であるため Table-1 にシャム群と対照群, および BPS 群の血液検査と尿検査の成績を示した。

対照群では血清中総蛋白質のみが, シャム群と比較して有意に低かった。一方 BPS 群との有意差は認められなかった。対照群の sCr と BUN, および尿蛋白質がシャム群と比べ僅かに高値を示す傾向にあったが有意差は認められなかった。また BPS 群においても同様であった。

2. 病理組織学的検査

シャム群の腎臓に特筆すべき病理組織学的変化は認められなかった (Fig-1A)。対照群では, 尿細管上皮の好塩基性変性が認められ (Fig-1B), 腎盂に隣接した腎実質の尿細管間質に, 線維化が全例で認められた (Fig-2, Fig-3)。また対照群では, 萎縮性尿細管上皮変性と線維化病巣内の尿細管上皮細胞は, その一部が内腔に剥離・脱落していた (Fig-2, Fig-3)。間質には紡錘形ないしは星芒状を呈する線維芽細胞が浸潤・増殖しており繊細な線維性結合組織の増生を伴っていた (Fig-2, Fig-3)。一方, BPS 群では尿細管の好塩基性変性, 尿細管拡張は対照群と比較して軽度であった (Fig-1C)。尿細管変性と尿細管拡張度の半定量的解析において, 対照群における尿細管上皮の好塩基性変性や尿細管拡張は, シャム群と比較して有意に高かった (それぞれ $p < 0.05$) (Fig-1 D, E)。一方, BPS 群では, 尿細管上皮の好塩基変性は, 対照群に比べ

て著明に減少し ($p < 0.05$) (Fig-1 D), 尿細管拡張は緩和されている傾向が認められた ($p = 0.0813$) (Fig-1 E)。定量的解析の結果, 対照群ではシャム群と比較して, 線維化領域の有意な増加が示された ($p < 0.05$) (Fig-4, D)。BPS 群では線維化領域は対照群に対して有意に減少し ($p < 0.05$), 尿細管間質の線維化に対する BPS による抑制効果が示された (Fig-4, D)。

Table 1 Blood examination and Urinalysis of Sham • Control • BPS group.

	Sham group	Control group	BPS group
	Mean±SE	Mean±SE	Mean±SE
BW (g)	370±4	385.0±18.1	401.7±5.2
RBC($10^6/\mu l$)	705±25	730.2±19.2	752.0±27.4
WBC($/\mu l$)	6300±813.6	3433±372.9	5933±407.2
PLT($10^3/\mu l$)	100.9±16.29	102.2±19.75	99.03±13.32
PCV(%)	43.6±1.2	44.1±0.9	45.7±2.1
Hb(g/dl)	14.2±0.4	13.6±0.3	14.2±0.4
Na(meq/l)	141.0±0.8	140.7±1.5	143.2±0.6
K(meq/l)	3.9±0.16	4.5±0.7	4.7±0.8
Cl(meq/l)	95.8±0.66	94.3±1.3	93.3±0.5
TP(g/dl)	6.1±0.2	5.5±0.1 ^{##}	6.1±0.1 ^{**}
TC(mg/dl)	64.0±2.7	59.7±5.4	65.0±3.1
sCr(mg/dl)	0.23±0.015	0.77±0.35	0.28±0.01
BUN(mg/dl)	23.7±0.9	41.7±12.0	27.3±1.2
Urine pH	8.1±0.3	7.6±0.2	7.8±0.1
Urine protein(score)	0.3±0.4	1.3±0.5	1.8±0.3

Data are shown as mean ± SE. **p < 0.01 vs. control group and ##p < 0.01 vs. sham group by Student's *t*-test

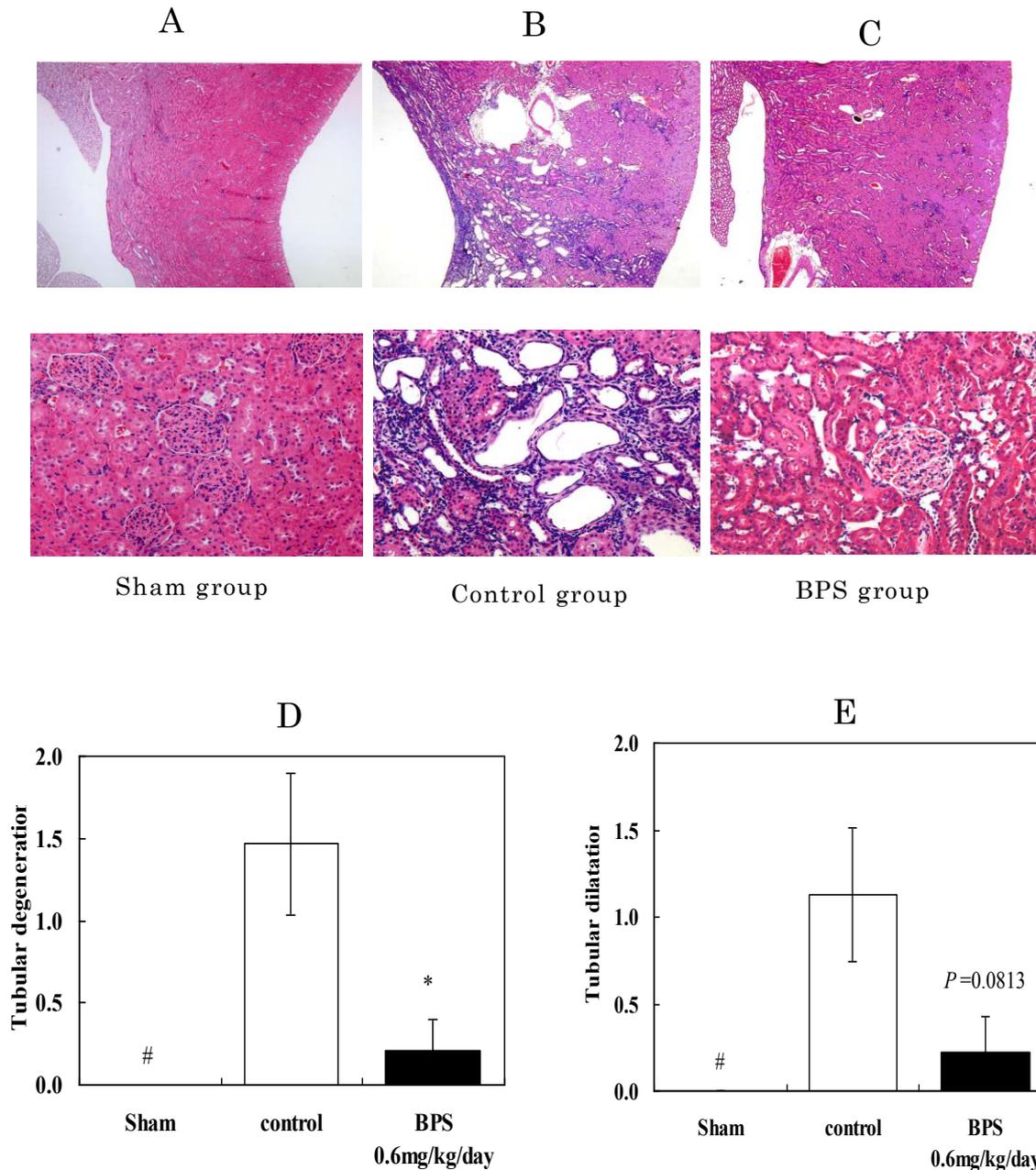
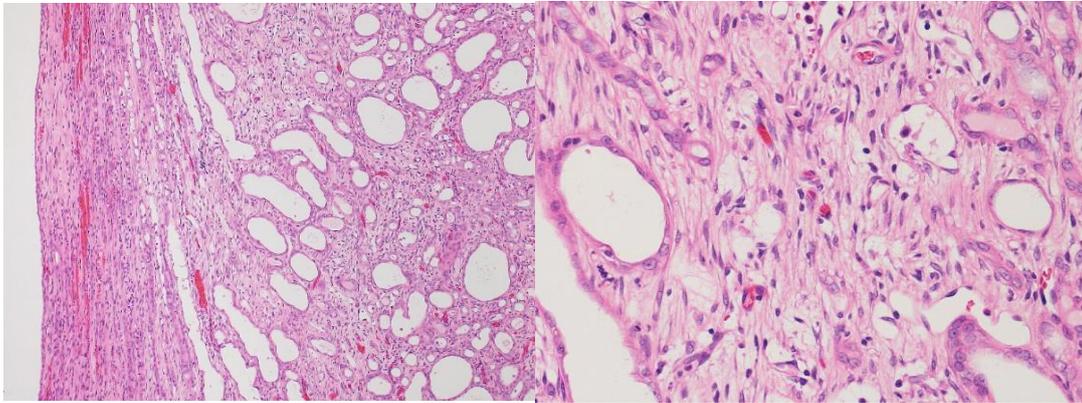


Fig- 1. Semi-quantitative analysis of urinary tubular degeneration and dilatation.

The effect of BPS on the renal damage in the PUUO model rat.

(Magnification: upper row, 4x ; lower row, 200x.) Photomicrographs of HE staining in representative kidney of PUUO rat.

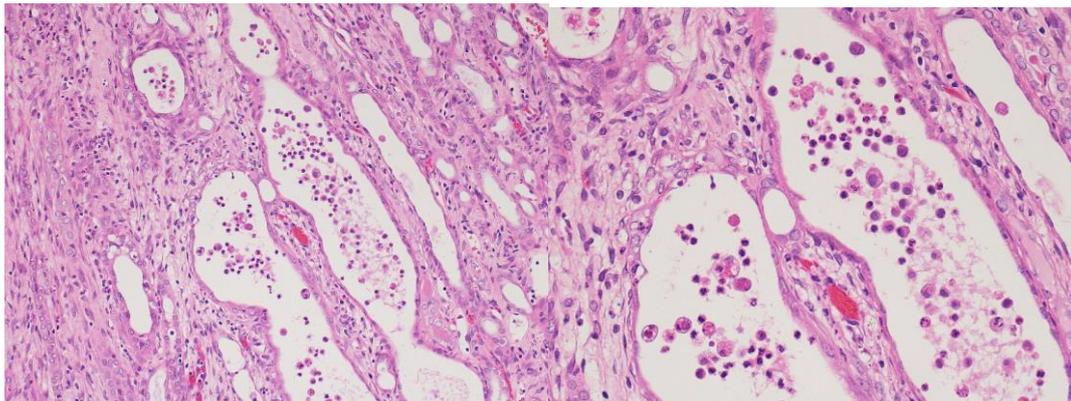
A: Sham rat, B: Control rat, C: BPS –treated rat. Marked basophilic degeneration of urinary tubular epithelium and urinary tubular dilatation were observed in the control group. In the BPS group, degeneration and dilatation of urinary tubules were mild compared to the control group. Semi-quantitative analysis of urinary tubular degeneration (D) and dilatation(E) are shown in the lower row. Data are means±SE. *p,#p<0.05 vs. control by the Wilcoxon test.



HE × 100

HE × 400

Fig-2 Histopathological findings in the kidney of control group. Tubulointerstitial fibrosis was observed in the control group.



HE × 100

HE × 400

Fig-3 Desquamation of urinary tubular epithelium in the kidney of control group. Infiltration of mononuclear cells and fibroblasts was observed in peritubular interstitium.

考 察

BPS は慢性腎不全の各種モデルラット [3, 82, 94, 99] やヒトの慢性腎不全 [17, 67, 76] で有用性が報告されている。これらの報告は CKD ネコに対して BPS が有用な治療薬となる可能性を示唆するものである。BPS を CKD ネコに対して臨床応用するには、CKD ネコに対する BPS の病理組織学的効果と臨床的効果の評価する必要がある。CKD ネコに対する BPS の病理組織学的な抑制効果の評価する方法として、実際にネコを用いて CKD ネコの病因である尿細管間質性腎炎を作成し、BPS の抑制効果の評価することである。しかし、ネコを用いた実験は倫理的に許可を得るのが困難という実情がある。そこで一般的な薬剤試験の実験用に用いられているラットを選択した。ネコとラットの腎臓は、解剖学的に構造が若干異なると考えられる。ネコの腎臓の解剖学的特徴として腎臓は腎小葉の集合体であり、ラットは腎葉の集合体と考えられる。しかし、腎臓機能および病理組織学的な評価に用いる事には問題はないと考えられる。

CKD ネコの病因である尿細管間質性腎炎と病態である尿細管変性および尿細管間質の線維化は、ラットを用いて従来の UUO モデルによって作成することが可能である。しかし UUO モデルでは腎臓内に著しい形態的变化が生じる。病理組織学的には尿細管間質の線維化とともに、尿細管の拡張など水腎症に象徴される顕著な腎臓の拡張性の変化が認められる [34]。一方、CKD ネコでみられる病理組織学的な変化は、尿細管間質の線維化に伴う腎臓の萎縮性変化である。そこで第 II 章では臨床時に遭遇する CKD ネコに類似した腎臓病ラットモデルを新たに作成し、BPS の尿細管障害および尿細管間質の線維化に対する効果を病理組織学的に評価した。

本研究では左尿管に 0.5 mm 径のサージカルワイヤーを併走させ、それらを 4-0 のナイロン糸にて結紮した後に、ワイヤーを抜去することで新たな PUUO ラットモデルを開発した。このモデルでは尿管閉塞解除 3 週間後の病理組織学的所見は、ヒトの閉塞性腎症の病理組織学的特徴と類似する。また尿管拡張や尿細管上皮細胞の萎縮、尿細管間質の線維化が進行するため、CKD ネコと類似した成体ラットの PUUO モデルとして有用であることが確認された。さらに水腫様変性や腎実質の菲薄化が、これまでの UUO モデルよりも軽度であった。

Sinic, Z.らは成体ラットの PUUO を 28 日後に解除すると、腎組織中で酸化ストレスマーカーが急激に増加することを示した [79]。Ogata, Y.らもラット UUO モデルにおいて尿管閉塞後、TGF- β (Transforming growth factor- β) や IV 型コラーゲンの mRNA (Messenger ribonucleic acid) 発現が増加し、閉塞解除後 14 日まで持続することを報告した [62]。そのためこのモデルにおいても PUUO によって増加する線維化の促進因子が閉塞解除後に急速に減少するのではなく尿細管障害や間質線維化の促進が持続していたと考えられる。

PUUO モデルラットを用いた腎臓病に対する BPS の病理組織学的評価について尿細管間質の線維化に関する報告はない。ヒトの糖尿病性腎症や、その他の様々な腎臓病では糸球体疾患が一次疾患とされているにも関わらず糸球体障害よりも尿細管間質障害の方が、より密接に腎臓機能低下や腎不全の進行と関連していると述べられている [55]。本研究の病理組織学的検査において対照群と比較して BPS 群の尿細管変性、尿細管拡張および尿細管間質の線維化が軽度であった。Sinic, Z.ら、Ogata, Y.らが報告したように尿管閉塞解除後も線維化の促進因子が持続するが、BPS の血管内皮細胞保護作用や抗炎症

症作用[29]，血管拡張作用，抗血小板作用[1, 58]，サイトカイン，ケモカインの抑制作用[46]，さらに腎血流の増加作用[83, 85]などにより腎臓組織の変性が抑制されたと考えられる。これらにより BPS は尿管閉塞で誘発される腎臓病に対する有効性が期待される。

本研究の対照群において，血液検査と尿検査項目のうちで TP だけが，他の 2 群に比べて低値を示した (Table-1)。腎炎症候群の様な尿蛋白質を大量に排泄する患者では，血漿蛋白質の低下が，しばしば観察される[21]。統計学的に有意な水準には達していないが，このモデルでは尿蛋白質の排泄が増加する傾向があり，このことは対照群における血漿中の TP の低下に関係があるかもしれない。BPS による TP 維持に関するメカニズムは不明であるが，尿蛋白質の改善は認められなかったことから TP に対する BPS の有用な効果は，尿蛋白質の減少を介するものではないと思われた。BPS 群は，対照群と比較しては体重や造血系項目，sCr や BUN に関して，有意差こそ認められなかったが，対照群よりも有益な傾向がみられた。このことは BPS 投与群の一般状態がより良いことを反映している可能性がある。それ故，一般状態の改善は BPS 群における TP 値の維持と関係があるかもしれない。

腎臓機能の悪化を反映する sCr と BUN の有意な増加は，このモデルでは観察されなかった。他の PUU0 モデル[95]や，完全 UU0 モデル[96]，閉塞腎での糸球体濾過率低下が，反対側の非閉塞腎の代償的な機能亢進と関連することがよく知られている。本試験のラットモデルにおいては sCr や BUN の明確な増加がみられないことから閉塞腎の腎臓機能低下に対する反対側の腎臓の代償的な反応が，働いていると思われる。そのため，このラットモデルは，これらの項目を用いた閉塞腎の腎臓機能評価には適してはいない。一方，前述の様な腎臓障害の病理組織学的評価に適していると考えられる。

本試験では自然発症の CKD ネコに類似した尿細管間質性腎炎を PUUO により作成し、その後、PUUO を解除して BPS の尿細管障害と尿細管間質線維化に対する効果を病理組織学的に評価した。その結果、PUUO 解除ラットモデルにおける尿細管間質線維化が BPS 群では顕著に抑制されていた。したがって、BPS は尿細管間質の線維化の程度が腎臓病の進行に深く関与しているとされる幅広い腎臓病の抑制にも効果があると考えられる。

小 括

新たに開発した PUUO 解除ラットモデルを用いて臨床の場で遭遇する CKD ネコに類似した尿細管間質性腎炎を作成した。BPS による CKD ネコの病態である尿細管障害や尿細管間質の線維化抑制効果を検討した。

1. 新たに開発した PUUO 解除ラットモデルによって、自然発症の CKD ネコに類似した尿細管間質性腎炎を作成した。PUUO 解除ラットモデルは尿管拡張や萎縮性尿細管上皮変性、尿細管間質の線維化を進行させた。したがって、本研究において開発した PUUO 解除ラットモデルは尿細管間質の線維化を検討するために有用であることが確認された。
2. PUUO 解除ラットモデルの有用性は、血液および尿を用いた腎臓機能評価には適さないが、腎臓病の病理組織学的評価に適していることが判明した。
3. BPS 群は病理組織学的検査ならびに組織切片を用いた線維化領域の半定量化および定量的評価において、対照群に対して線維化領域は有意に減少していたことから、尿細管間質の線維化に対する BPS の抑制効果が明らかとなった。

以上から新たに開発した PUUO 解除ラットモデルにおいて、BPS が尿細管障害や尿細管間質の線維化を阻止し得ることが判明した。

第 Ⅲ 章

健常ネコにおけるベラプロスト ナトリウムの安全性評価

序 文

獣医学領域において慢性腎臓病（CKD）は一般的で深刻な疾患であり，特に10歳齢以上のネコでは，高頻度に発症する[73]。近年，CKDネコの患者数は高栄養ペットフードの供給や，獣医療の進歩によってネコの高齢化が進んだことから増加傾向にある[14]。従来からCKDネコの基本的治療は，食事療法[68]であり，さらに進行したCKDの治療法として尿毒症軽減のために輸液療法[74]が行なわれている。また薬物療法としてヒトと同様にアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）であるベナゼプリルがネコのCKDにも使用されているが[32, 47]，その治療効果は必ずしも満足するものではなくネコのCKDに対する治療薬が望まれている。

プロスタサイクリン（ PGI_2 ）およびその誘導体には，血小板凝集抑制[58]，血管拡張[1]，平滑筋の遊走と増殖の抑制，血管新生の促進[66]および肝細胞保護作用[2, 63]，血管内皮細胞保護などの多彩な生理作用が知られている[1, 2, 3]。

ベラプロストナトリウム（BPS）は PGI_2 の誘導体であり， PGI_2 と同様の薬理作用を有する。また，そのCyclo-pentabenzofuranyl structureのため化学的に安定であり，高い経口生物学的利用能と長い生物学的半減期を有する[92]。すでにヒトの医療分野においてBPSは末梢血管の血栓症の治療[10, 41, 43, 49]および一次性および二次性肺高血圧症の治療[5, 51]に長年に亘り臨床応用されている。また最近では慢性腎不全の各種モデル[3, 82, 94, 99]やヒトの慢性腎不全[17, 67, 76]での有用性が報告されている。さらに糸球体腎炎ラットモデルではBPSが尿蛋白質，BUNの増加を抑制し，腎臓病の進行過程で重要な位置を占める腎臓間質の線維化に関する Monocyte

chemoattractant protein 1(MCP-1)およびコラーゲン mRNA 増加も抑制する [62]。そして第 II 章では PUUO により自然発症 CKD に類似した尿細管間質性腎炎を作成し、BPS が尿細管間質の線維化を著しく抑制することを病理組織学的な半定量および定量解析により明らかにした [82]。これらの報告は CKD ネコに対して BPS が有用な治療薬となる可能性を示唆するものである。しかしながら、プロスタグランジン系薬剤は動物種によりその感受性が大きく異なる [58]ことから、BPS を CKD のネコに臨床応用するにあたって、安全性から投与量の設定が不可欠と考えられる。しかしながら現在までその報告はない。

第 III 章では BPS を CKD ネコに対して臨床応用するために健常ネコを対象に、BPS の副作用や有害事項の種類と程度を先行のラット、イヌ、ヒトの成績と比較し、安全性と有効性および安全な経口投与量を設定した。

材料および方法

1. 供試動物

年齢が1～6歳齢、体重が2.4～4.5 kgの11頭の健常ネコ（全て雑種、雄6頭、雌5頭）を用い、東京農工大学の「実験動物の治療と取扱いに関するガイドライン」に従って本試験を実施した。各ネコは個別ケージに収容し、室温24℃の環境下で飼育した。BPSの投与は、給餌（Hill's SCIENCE DIET Adult, 日本ヒルズ・コルゲート株式会社, 東京）後1時間に実施し、水は常時自由に摂取させた。これらの11頭の供試ネコをBPS投与群6頭（雄3頭、雌3頭）、Vehicle群5頭（雄3頭、雌2頭）に分け、それぞれBPSとVehicleの投与に供した。

2. BPS と Vehicle

BPSはTORAY（東レ株式会社, 東京）より100 mg入手した。Vehicleとしてポリエチレングリコール400（PEG-400, 和光純薬, 大阪）を用いた。

BPSは安全な化合物であるが[38, 68], PEG-400でBPSを所定濃度に希釈してカプセル（サイズ5, 塩野義製薬, 大阪）にマイクロピペット（GILSON MICROMAN, エムエス機器株式会社, 東京）で50 μ lずつ充填し、使用時まで冷蔵庫内に保存した。Vehicle群用としては50 μ lのPEG-400のみをカプセルに同様に充填し、冷蔵庫内に保存した。

3. BPS の投与量の設定

BPS の供試ネコへの投与量は BPS の代表的な薬理作用である血小板凝集抑制作用およびラット [28]、イヌ [23] およびヒト [30, 31] での安全性試験の成績を参考に設定した。BPS のイヌの 3 ヶ月多回投与毒性試験においては無毒性用量が 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とされ、250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では軟便や下痢などの消化器症状を示すことが報告されている [23]。ネコに対する BPS の薬理作用は BPS の代表的な作用である血小板凝集抑制作用において 50 %作用濃度 (EC50) がヒト、ネコ、イヌ、ラットの順に低値をとることが報告されている [58]。すなわち BPS に対する感受性が最も高いのはヒトでありネコ、イヌ、ラットの順である。これらからネコの BPS に対する感受性を考慮してネコより BPS の感受性が低いイヌの BPS 多回投与毒性試験での無毒性用量を参考とした。すなわち、ネコでの試験用量としてイヌの無毒性用量の約 1/3 にあたる 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から開始し、副作用に十分注意しながら 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ まで増量することとした。

4. BPS の投与方法

ネコでの試験用量としてイヌの無毒性用量の約 1/3 にあたる 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から開始し、副作用に十分注意しながら 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ まで増量することとした。可能な限り被検個体数を少なくするため、BPS 投与群 (n=6) では同一のネコに対し投与期間と休薬期間を設定し、順次用量を増加する 4 段階投与、計 10 週間の試験方法を採用した (Fig - 1)。またヒトの臨床実績と同様に 1 日に複数回の BPS 投与 [31, 99] の必要性をネコの臨床応用でも想定し、ネコへの BPS

投与は12時間ごとの1日2回とした。投与期間と休薬期間もヒトでのBPS臨床試験[31, 61]を参考にそれぞれ1週間および2週間とした。

Fig-1に示したように第1段階にBPSの10 µg/kg/bid.の7日間投与を行い、以下2週間の休薬期間を挟んで第2段階30 µg/kg/bid. 第3段階で70 µg/kg/bid. 第4段階で100 µg/kg/bid.のBPS投与を実施した。またBPSの投与は給餌後1時間に実施した[38, 74]。Vehicle群(n=5)は50µlのPEG-400のみをカプセルに充填しBPS投与群と同様に同一ネコに対して7日間の投与期間と2週間の休薬期間を設定し12時間ごとの1日2回投与した。

5. BPS 単日投与および連日投与試験

BPSの各投与量の投与実施の初日を単日投与とし、7日間を連日投与とし試験項目を設定した。

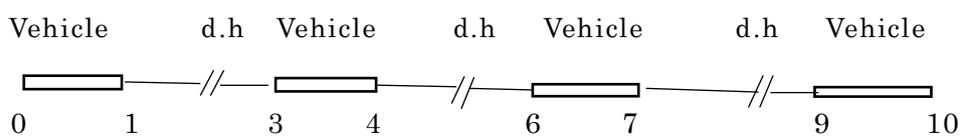
(1) BPS 単日投与試験 (各投与量)

- ①BPSおよびVehicleの単日投与における有害事項の観察。
- ②BPSおよびVehicleの単日投与における心拍数、血圧の測定。

(2) BPS 連日投与試験 (各投与量)

- ①BPSおよびVehicleの連日投与における有害事項の観察。
- ②BPSおよびVehicleの連日投与におけるBPS投与前後の体重の測定。
- ③BPSおよびVehicleの連日投与におけるBPS投与前後の血液学的検査。

Vehicle Group (n=5)



BPS Group(n=6)

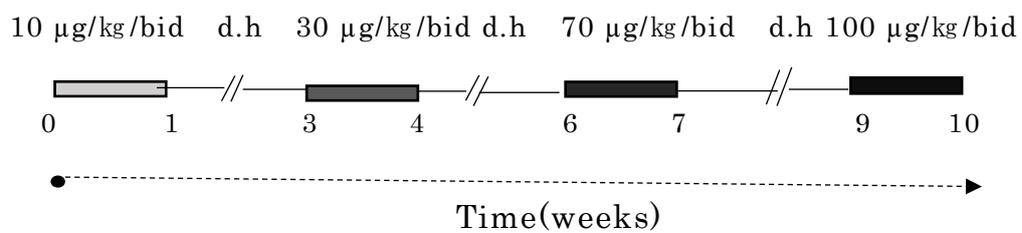


Fig-1 Experimental schedule and dosing.
d.h; drug holiday (washout period)

6. BPS 単日投与および連日投与における有害事項の観察と体重測定

BPS の各投与量の投与実施の初日を単日投与とし，7 日間を連日投与として試験項目を設定した。

(1) BPS 単日投与試験における有害事項の観察

BPS 群および Vehicle 群の単日投与は BPS および Vehicle 投与後の歩行困難，鎮静，横臥，口腔粘膜の充血，流涙，流延，嘔吐，下痢および失禁などの有害事項の有無を速やかに確認するために BPS 投与後 0.5 時間目，3 時間目および 12 時間目に観察した。

(2) BPS 連日投与試験における有害事項の観察

①BPS 群および Vehicle 群の連日投与は BPS 単日投与と同様に BPS および Vehicle を投与して有害事項を 0.5 時間目，3 時間目および 12 時間目を 7 日間連日観察した。

②体重測定は，BPS および Vehicle の各投与量の初日および 7 日目の食前に実施した。

7. BPS 単日投与における血圧および心拍数測定

BPS 群および Vehicle の各投与量の初日を単日投与として BPS 投与前後に於いて収縮期血圧，拡張期血圧および心拍数を測定した。測定は投与前（0 時間目）および 0.5 時間目，1 時間目，2 時間目および 3 時間目の 5 時点とし，覚醒下において前腕に巻いた Sphygmometer（オシログラフ，Life Scope9，

日本光電，東京）により測定した。測定は各 5 回実施し最小値および最大値を除いた残り 3 値の平均値をもって測定値とした。

8. BPS 連日投与における血液学的検査

BPS 連日投与における BPS 投与群と Vehicle 投与群の投与前後の血液学的検査を実施した。

採血は各投与量の初回投与 0.5 時間前および 7 日目の最終投与の 1 時間後に橈側皮静脈より行った。採取した血液は，EDTA チューブ（富士フィルム株式会社，東京）と血清分離用採血管（極東製薬株式会社，東京）に入れ，それぞれ血液検査と血液化学検査に用いた。RBC，WBC，PLT，Ht，Hb は自動血球計算機（セルタック MEK-5258，日本光電株式会社，東京）を用いて測定した。sCr，BUN，aspartate aminotransferase（AST），alanine aminotransferase（ALT），Na，K，Cl を臨床検査機関（福山臨床検査センター株式会社，広島）に依頼して測定した。

9. 統計解析

試験を受けた全ての供試ネコを安全性解析の対象（安全性解析対象）に含めた。結果は平均値±標準偏差あるいは標準誤差で示した。データの統計解析は StatView J-4.5（HulinKs Co.，東京）で行った。Vehicle 群と BPS 群との比較は対応のない 2 群の *t*-検定で実施した。Vehicle 群および BPS 群において，10 µg/kg、30 µg/kg、70 µg/kg および 100 µg/kg 投与前後の比

較を対応のある t 検定で実施した。p 値が 0.05 未満（あるいは 0.05<）の場合には有意差ありと判定した。

成 績

1. BPS 単日投与および連日投与における有害事項の観察と体重測定

(1) BPS 単日投与試験

BPS10 から 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の投与では全ての供試ネコで臨床症状の変化は、認められなかった。100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ 初回投与の 0.5 時間目に 6 頭中 1 頭に嘔吐がみられた。12 時間後の第 2 回目の投与では認められなかった。嘔吐の症状は短時間で消失し、一過性のものであり 12 時間後の次回投与までには、これらの症状は完全に消失し食欲減退なども認められなかった。歩行困難、横臥、口腔粘膜の紅潮、流涎、流涙および失禁は、各投与量において単回投与試験では認められなかった。

Vehicle 群においては、Vehicle 投与における有害事項は認められなかった。

(2) BPS 連日投与試験

BPS10 および 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の投与では全ての供試ネコで何ら臨床症状の変化は、認められなかった。70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の投与 2~3 日目にかけて供試ネコ 6 頭中 2 頭に嘔吐、下痢が認められ、5~6 日目に供試ネコ 6 頭中 1 頭に下痢の有害事項が認められたが、1 日目、4 日目、7 日目は、有害事項は認められなかった。100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の投与では 1 日目に供試ネコ 6 頭中 1 頭に嘔吐、2~3 日目に供試ネコ全頭に嘔吐、下痢、鎮静が認められた。4~5 日目に供試ネコ 6 頭中 4 頭に嘔吐、下痢、鎮静が認められ、6 日目に供試ネコ 6 頭中 1 頭に下痢が認められたが、7 日目の有害事項は認められなかった。これ

ら有害事項の発現は，BPS 投与の初回にはほとんど認められず，投与 2～5 日目に集中し，6 日目，7 日目には再び発現頻度は著しく減少した (Table-1)。嘔吐，下痢，鎮静の症状は，第 1 回の投与で認められる場合、第 2 回目に認められる場合、両方で認められる場合もあった。これらの有害事項は，短時間で消失し，一過性のものであり 12 時間後の次回投与までには，これらの症状は完全に消失し食欲減退なども認められなかった。歩行困難，横臥，口腔粘膜の紅潮，流延，流涙および失禁は，認められなかった。Vehicle 投与群では，試験期間を通じて有害事項の発現は認められなかった。

試験期間中に BPS 投与による体重の増減は Vehicle 群に対する比較においても BPS 群における BPS 投与前後での比較においても認められなかった (Table-2)。

2. BPS 単日投与における血圧および心拍数

BPS 単日投与試験における血圧については，100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与により投与後 0.5 時間目に収縮期血圧が低下する傾向がみられたが有意な差は認められなかった。その他の投与量において収縮期血圧，拡張期血圧および脈圧ともに有意な変化は認められなかった (Table-4)。

BPS 単日投与試験では心拍数の有意な増加は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPS の単日投与では認められなかったが，30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以降，用量依存性で有意な増加を認めた。投与量によらず最大反応は投与後 0.5 時間目であり，その後速やかに投与前の値に復した。この一過性の心拍数増加と短時間での回復は BPS の各投与量の単日投与に毎回同じパターンで繰り返された (Table-3, Fig-2)。

Vehicle 投与群は、全試験期間を通じて、心拍数と血圧のいずれにおいても有意な変化は認められなかった (Table-3, Table-4)。

3. BPS 連日投与における血液学的検査所見

RBC は BPS の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与前と 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与後の 2 点で Vehicle 群との比較で有意な差が認められた ($p < 0.05$)。一方、BPS 投与前後では、RBC の有意な増減は認められなかった。WBC, PLT, Ht および Hb 濃度については全試験期間を通じて Vehicle 群との比較で有意な差はみられなかった (Table-5)。

血中の Na, K, Cl 濃度に関しては、血中 Na 濃度が BPS の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与後に有意に増加し ($p < 0.05$)、Vehicle 群との間にも有意の差が認められた ($p < 0.01$)。BPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与前後には有意な変化は認められなかったが、Vehicle 群において僅かに低下したため、両群間に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。しかし、それらの変化はいずれも 1 % とわずかなものであった。K は、Vehicle 群に対し 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の BPS 投与では、7 週目の時点で K の有意な低下を示した ($p < 0.05$) が、その前後の BPS 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 用量では Vehicle 群に対する差は認められなかった。Cl は、Vehicle 群に対し 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 7 週目の時点で 3 % の有意な増加 ($p < 0.05$) を示したが、より高用量の BPS 投与では両群間に差は認められなかった (Table-5)。

BPS 投与群は用量依存性に sCr 濃度を低下させ、Vehicle 群に対し統計学的有意差が 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与後から認められ ($p < 0.01$ および $p < 0.05$)、休薬期間中に低下した sCr 値が再上昇する傾向がみられた (Fig-3 a)。sCr の低下率は、初期値に対して 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与後 7 週目で 20 %、100

µg/kgの投与後 10 週目で 31 %の低下であった。Vehicle 群においては、変化は認められなかった。

一方、BUN に関しては BPS 投与群内を各試験時点間で比較した場合、10 µg/kg の BPS 投与後から BUN 値の低下傾向がみられ、70 µg/kg 投与後 7 週目に 22%の低下を認めた (Fig-3 b)。BUN 値についても sCr 値と同様に休薬期間中 (4-6 週目および 7-9 週目) にその値が再上昇する傾向がうかがえた。

Vehicle 群と比較した場合、BPS 投与群の血中 AST, ALT 値は有意な変動を認めなかった (Table-5)。しかし、BPS 投与群内での比較では明らかに AST ならびに ALT 値の低下の傾向が認められた。初期値からの変化率を Fig-4 で示した。その結果、AST 値低下の傾向は 10 µg/kg/bid. の BPS 投与後から始まりその後も BPS 投与および休薬中の両期間を通じて正常値範囲内で低 AST 値を維持し続けた。一方、Vehicle 群内での AST の有意な経時的変化は認められなかった (Table-5, Fig-4a)。ALT 値についても BPS 投与群内では AST 値と同様に低下する傾向がみられた。その結果、70 µg/kg の BPS 投与開始時の 6 週目には初期値 (0 週目) と比較し、40 %の低下がみられた。平均値の推移からも明らかなように sCr ならびに BUN 値とは異なり、AST ならびに ALT 値は共に休薬期間中に再上昇する傾向は認められなかった (Fig-4 b)。AST ならびに ALT 値は試験開始前に BPS 群が有意に高かったが ($p < 0.05$) Vehicle 群と比較し試験期間中に BPS 群の AST ならびに ALT 値は低下し Vehicle 群と有意差が認められなくなった (Table-5)。

Table-1 Observation of adverse events in administration of BPS and Vehicle for 1 or 7days

Dose of BPS	On Day	Cat No					
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
10 µg/kg/bid	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
30 µg/kg/bid	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
70 µg/kg/bid	1						
	2		V,D			D	
	3					D	D
	4						
	5			D			
	6	D					
	7						
100 µg/kg/bid	1					V	
	2	D	D	V,D	S,D	S,D	D
	3	D	D	D	V,D	S,D	D
	4			D	D	D	V
	5		V,D	D		S	S
	6					D	
	7						

V: vomiting D: diarrhea S: sedation a blank means no adverse event.

Table-2 Weight measurement before and after of administration of BPS or Vehicle for 7 days

Cat Group		Dosage of BPS							
		10µg/kg		30µg/kg		70µg/kg		100µg/kg	
		Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Body weight	Vehicle	2.8±0.5	2.7±0.5	2.8±0.6	2.8±0.5	2.9±0.5	2.8±0.5	2.8±0.5	2.8±0.6
(kg)	BPS	2.9±0.6	2.9±0.5	2.9±0.5	2.8±0.5	3.0±0.6	3.0±0.5	3.0±0.5	2.9±0.5

After: One hour after the administration of Vehicle or BPS on day 7.

Table-3 The effects of BPS administration on the heart rate(bpm).
BPS or Vehicle 1 day administration trial.

Cat Group	Time after the administration of BPS(hr)				
	0	0.5	1	2	3
Vehicle	132±6	132±8	133±8	131±3	131±5
10µg/kg	130±5	129±4	131±6	128±4	130±4
30µg/kg	131±3	144±5*	137±2	132±6	130±3
BPS 70µg/kg	129±6	152±8**	144±6	129±6	127±4
100µg/kg	129±4	158±5**	149±4	135±4	130±5

Data are shown as mean ± SD. *p<0.05 and ** p<0.01 in comparison between the BPS group and the vehicle group by Dunnet's- test

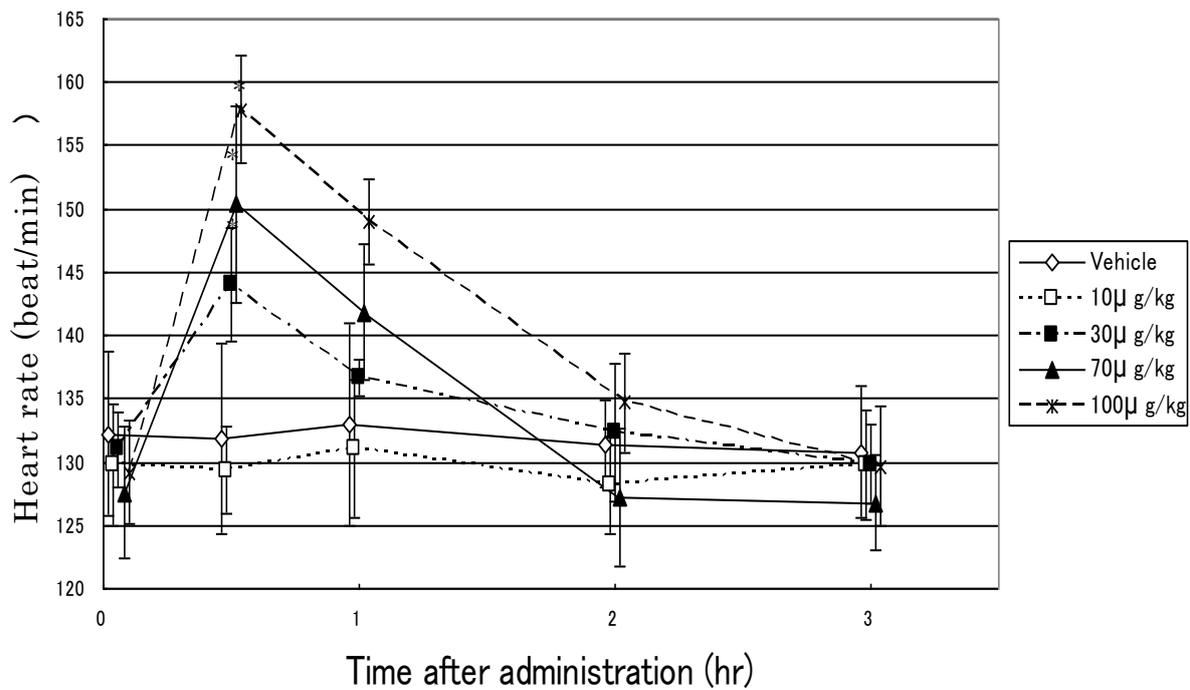


Fig-2 The changes of heart rate with BPS or Vehicle administration .
 BPS or Vehicle 1 day administration trial.
 Data are shown as mean \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in comparison
 between the BPS group and the vehicle group by Dunnet's- test

Table-4 The effects of BPS administration on the blood pressure.
BPS or Vehicle 1 day administration trial.

Blood pressure (mmHg)	Group	Time after the administration of BPS(hr)				
		0	0.5	1	2	3
Systole	Vehicle	142±12	141±10	138±6	138±11	137±6
	10µg/kg	133±22	132±14	125±15	134±15	129±13
	BPS 30µg/kg	129±11	127±8	124±9	126±13	126±9
	70µg/kg	135±14	130±15	129±13	130±11	130±12
	100µg/kg	131±15	124±17	130±15	128±14	122±11
Diastole	Vehicle	71±6	68±2	69±7	70±6	69±6
	10µg/kg	74±13	74±9	71±9	77±11	72±10
	BPS 30µg/kg	68±6	67±6	67±6	68±7	69±5
	70µg/kg	71±11	68±11	69±7	70±7	69±7
	100µg/kg	71±12	65±10	69±13	68±8	64±4

Data are shown as mean±SD.

Table - 5 The effects of BPS or Vehicle administration on the findings of blood examination. BPS or Vehicle 7 days administration trial.

Group		Dosage of BPS							
		10 μ g/kg		30 μ g/kg		70 μ g/kg		100 μ g/kg	
		Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
RBC (x10 ⁴ / μ l)	V	728 \pm 35	759 \pm 48	772 \pm 36	738 \pm 61	809 \pm 28	788 \pm 24	783 \pm 63	702 \pm 70
	B	838 \pm 96*	816 \pm 112	836 \pm 79	803 \pm 56	761 \pm 126	770 \pm 149	816 \pm 84	830 \pm 101*
WBC (x10 ² / μ l)	V	124 \pm 59	102 \pm 34	110 \pm 37	118 \pm 42	110 \pm 49	118 \pm 38	120 \pm 46	115 \pm 35
	B	135 \pm 37	135 \pm 25	122 \pm 24	114 \pm 21	140 \pm 39	139 \pm 48	120 \pm 41	131 \pm 36
PLT (x10 ⁴ / μ l)	V	58 \pm 22	66 \pm 23	53 \pm 11	56 \pm 13	55 \pm 24	72 \pm 24	51 \pm 13	60 \pm 7
	B	46 \pm 34	53 \pm 39	65 \pm 45	67 \pm 50	64 \pm 32	69 \pm 42	52 \pm 38	54 \pm 47
Hb (g/dl)	V	12.2 \pm 1.4	12.9 \pm 1.3	12.8 \pm 1.5	12.6 \pm 0.9	13.5 \pm 0.9	11.5 \pm 1.4	12.4 \pm 1.2	11.8 \pm 1.5
	B	13.1 \pm 1.6	12.4 \pm 1.1	12.6 \pm 1.0	11.7 \pm 0.8	11.8 \pm 0.9*	11.6 \pm 1.2	11.6 \pm 0.9	11.8 \pm 1.2
Na (mM)	V	154 \pm 1	154 \pm 0	155 \pm 1	154 \pm 1	155 \pm 1	155 \pm 1	155 \pm 1	154 \pm 1
	B	154 \pm 1	156 \pm 1**	154 \pm 3	154 \pm 2	153 \pm 2	153 \pm 3	152 \pm 2	152 \pm 2*
K (mM)	V	4.2 \pm 0.2	4.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	4.5 \pm 0.2	4.4 \pm 0.3	4.5 \pm 0.2	4.3 \pm 0.2	4.3 \pm 0.2
	B	4.1 \pm 0.4	4.2 \pm 0.2	4.4 \pm 0.5	4.2 \pm 0.3	4.1 \pm 0.4	4.2 \pm 0.2*	4.2 \pm 0.4	4.3 \pm 0.4
Cl (mM)	V	115 \pm 2	114 \pm 2	113 \pm 2	115 \pm 2	113 \pm 2	114 \pm 1	116 \pm 2	115 \pm 2
	B	113 \pm 2	117 \pm 2*	115 \pm 3	115 \pm 2	113 \pm 1	114 \pm 4	116 \pm 2	117 \pm 2
sCr (mg/dl)	V	1.3 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
	B	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2*	1.2 \pm 0.3*	1.0 \pm 0.2**
BUN (mg/dl)	V	20.3 \pm 4.4	22.9 \pm 4.2	19.1 \pm 2.2	18.7 \pm 2.8	18.9 \pm 2.3	20.1 \pm 2.8	20.8 \pm 1.5	21.4 \pm 2.8
	B	25.8 \pm 7.3	22.4 \pm 2.3	21.7 \pm 4.3	21.0 \pm 2.7	24.2 \pm 3.1*	20.1 \pm 2.4	23.2 \pm 4.0	21.6 \pm 4.0
AST (units/l)	V	24 \pm 5	33 \pm 8	26 \pm 6	29 \pm 8	27 \pm 10	26 \pm 9	27 \pm 6	27 \pm 7
	B	41 \pm 14*	34 \pm 10	28 \pm 9	29 \pm 9	28 \pm 10	28 \pm 10	26 \pm 7	25 \pm 6
ALT (units/l)	V	41 \pm 5	53 \pm 11	57 \pm 8	51 \pm 9	56 \pm 16	49 \pm 13	51 \pm 12	49 \pm 12
	B	72 \pm 26*	61 \pm 16	60 \pm 28	60 \pm 33	46 \pm 13	44 \pm 13	60 \pm 33	60 \pm 23

V: Vehicle B: BPS

After: One hour after the administration of Vehicle or BPS on day 7.

Data are shown as mean \pm SE. *:p<0.05, **:p<0.01 versus vehicle treatment-group by unpaired t-test†:p<0.05, ††: p<0.01 versus before treatment value of same dosage by Paired t-test.

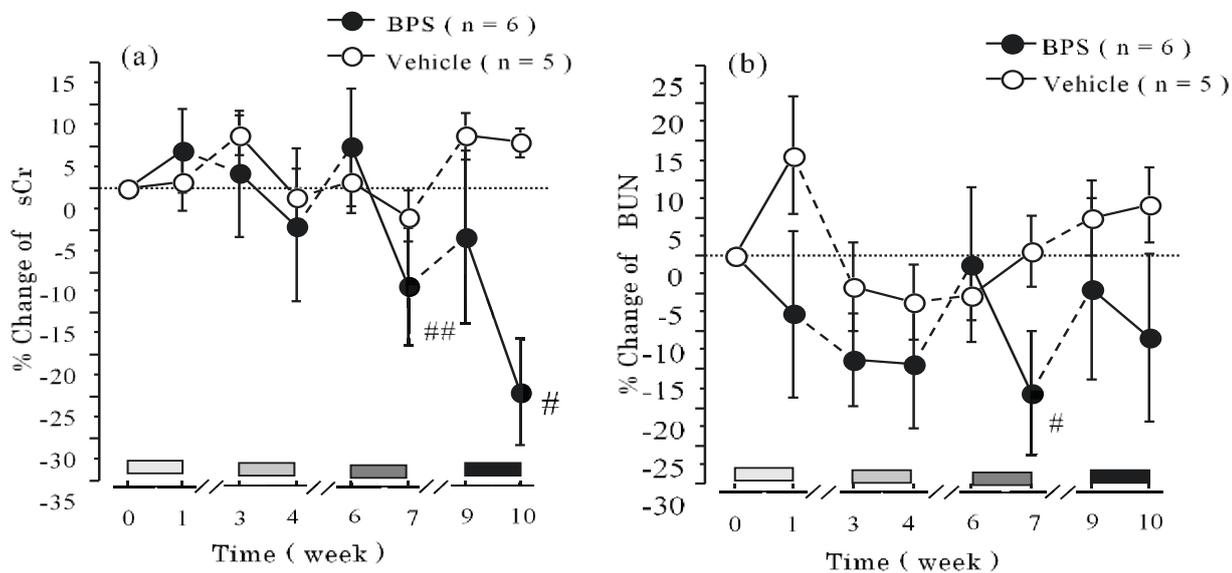


Fig-3 The changes of renal parameter during the experiment. BPS or Vehicle 7 days administration trial.

Horizontal bars in each figure represent the period of BPS treatment (from left to right; 10, 30, 70 and 100 µg / kg / bid). All values were expressed as mean ±SE.

Statistical analysis was performed using Wilcoxon's signed – rank test. ## : p<0.01, #:p<0.05 versus before treatment values of same dosage by Paired t-test.

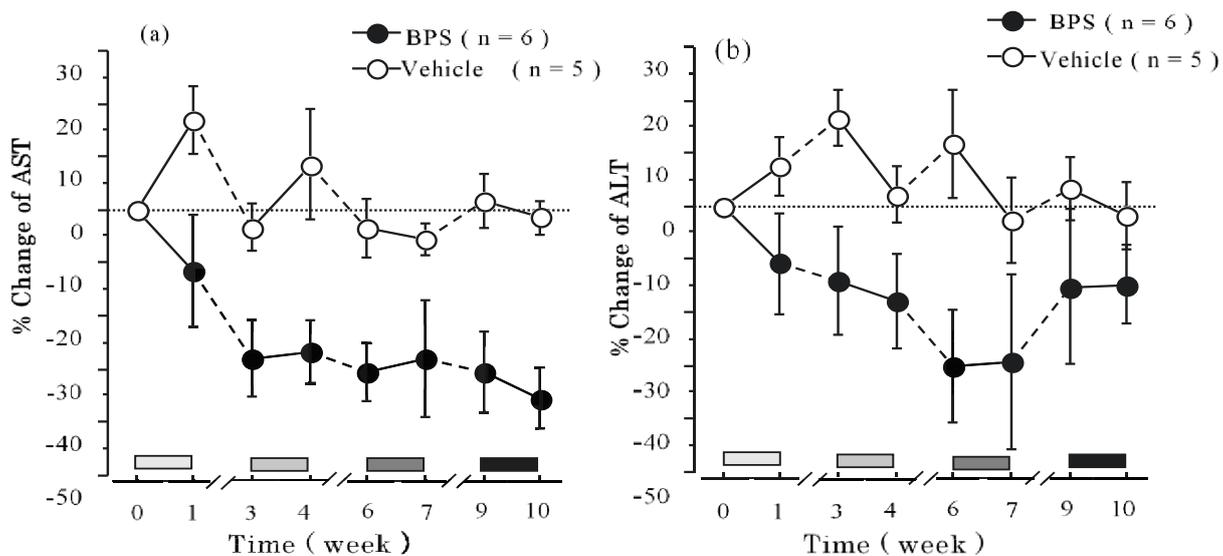


Fig-4 The changes of hepatic parameter during the experiment. BPS or Vehicle 7 days administration trial. Horizontal bars in each figure represent the period of BPS treatment (from left to right; 10, 30, 70 and 100 µg / kg / bid). All values were expressed as mean ± SE.

考 察

健常ネコに各投与量の BPS を単日投与し，血圧の変動を伴わない心拍数増加が認められた。BPS を連日投与し，血球数および血液 Na, K, Cl 濃度への無影響と sCr と BUN の低下もしくは低下傾向，ALT および AST の低下傾向が認められた。BPS の単日および連日投与において有害事項（嘔吐，下痢，鎮静）の出現する用量を明らかにした。

BPS 投与により麻酔下では血圧の低下が認められるが心拍数は変化しないとされる。一方，覚醒下では逆に心拍数は増加と血圧は無変化が，ラットおよびイヌにおいて報告されている[50]。この麻酔処置の有無において反応の差異は，生体の代償機能の作動の有無である。すなわち覚醒下での心拍数増加は，BPS の血管拡張作用による血圧低下に対する迷走神経反射によるものである[50]。健常なヒトの Phase 1 試験において血圧変化を伴わない軽度の心拍数増加が，低用量 BPS 投与で認められている[31, 72]。本研究における心拍数増加が一過性である点も含め，ネコの心血管系に対する BPS の作用は，他動物およびヒトでの成績と一致していた。心拍数増加で代償しきれない血圧低下が存在する場合は別として[38]，ヒトの患者（脳血管障害）では心拍数増加をもって BPS 投与を中止しないため[89]，本試験も継続しネコでの BPS 増量を行った。

BPS の投与時の有害事項はラットでは 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [23]，イヌでは 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [75]，ヒトでは 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [89] の BPS 投与から発現している。したがって今回使用するネコの平均体重が 3.3 kg であることから，BPS の有害事項の発現用量は体重比からはラットとイヌの中間と推定される。一方，BPS の代表的な薬理作用である血小板凝集抑制効果の種間比較ではヒト血小板が BPS に

対して最も感受性が高く、それ以降は、ネコ、イヌ、ラットの順に低感受性となる[58]。したがってネコへの適切な試験用量はヒトとイヌの間で、かつイヌに近いと推定し、低用量から慎重にBPSを増量する試験を実施した。

本試験においてBPSは供試ネコの血球数、Ht、Hb濃度に影響を与えなかった。この結果は、イヌの3ヶ月亜急性毒性試験[23]および健常のヒトでのPhase 1試験[31]の成績に一致した。一方、ラット亜急性毒性試験ではRBC、Ht、PLTの減少が報告されているが、高用量(1,000 µg/kg/day)BPS投与での反応であり、かつ変動幅は小さい[75]。BPS投与により血中Na、K、Cl濃度が有意に上昇した試験区があったが、その増加率は小さく、また用量依存性の欠如から偶発的な変化と思われる。これらの血中イオン濃度はイヌおよびヒトのBPS安全性試験でも変化を示していない[23, 31]。唯一ラットのみ血中Na、K、Clの有意な低下が報告されているが、毒性領域である5,000 µg/kg BPS投与での反応である[75]。すなわち血球および電解質に関してもBPSの影響はネコ、ラット、イヌおよびヒトに共通してほとんど認められない。

BPSの安全性についてはラットおよびイヌでの経口連続投与による3ヶ月亜急性毒性試験で紅潮、下痢、鎮静、嘔吐、流涙そして横臥が副作用として報告されている[23, 75]。健康ヒトへのBPS単日投与では一過性かつ軽度の顔面紅潮、動悸亢進、頭痛、上腹部痛が[30]、さらに10日間の連日経口投与試験においても顔面紅潮、充血感、頭痛、食欲不振、吐気、嘔吐が副作用として報告されている[89]。すなわち主に末梢循環系、神経系および消化器系への副作用がラット、イヌ、ヒトに共通している。

一方、血管拡張に伴う臨床症状に関しては、若干の種差があるように思われる。その背景にはBPSに対する動物種によって異なる体内臓器や組織の血管拡張反応の感受性差による血流配分の違いが示唆される。すなわち皮膚の

紅潮出現の有無に関しては顔面紅潮が観察されるラットとヒトと、観察されないイヌとネコの2グループに分かれる。皮膚の末梢血管拡張による顔面紅潮、頭痛は健康なヒトおよび患者の別なく報告されている[43, 90]。ラットにおいて耳介、四肢および口腔周囲の紅潮が比較的低用量(200 µg/kg/day)のBPS投与で出現する[75]。一方、ネコでは100 µg/kg/bid.(200 µg/kg/day)投与でも耳介や粘膜部での紅潮は全く認められなかった。今回のネコによる結果は、より高濃度(2,500 µg/kg/day)BPS投与でも紅潮出現のないイヌの成績に近い[23]。ネコはBPS投与後に血圧の変動がみられず心拍数が増加することから、ネコ体内のいずれかの血管が拡張していると思われる。種間比較による直接的な証明は無いが、イヌでは腸間膜動脈および腎動脈は、大動脈、冠動脈および脳動脈に比べて、少量のBPS投与で弛緩する報告がある[1]。ヒトとラットグループとネコとイヌグループの顔面紅潮に対する違いが、BPSの各組織および臓器への血流配分の違いによるものと考えると、BPSによる腎臓および肝臓の検査項目の改善効果も合理的に説明できる。

腎臓への作用、すなわちBPSによるsCr低下の相対感受性は、ラットとヒトおよびネコとイヌの二つのグループに分かれ、前述の顔面紅潮出現の有無別のグループ分けに一致するようである。すなわち本試験では健常の供試ネコでsCr値低下が比較的低用量のBPS投与から観察できた。健常イヌにおいても報告者は強調していないものの、BPSによるsCr値の低下傾向を測定数値から示している[23]。現時点では、BPSが一般的に正常値範囲にある健康なネコのsCr値を低下させる詳細な機構や生理的意義は不明である。一方、健常ネコにBPS 60 µg/head(平均値±SD: 18.56±2.02 µg/kg)を投与し30分後にdirectional power doppler装置(デジタル超音波診断装置EUB-750, 日立メディコ, 東京)を用いて弓状動脈の血流を測定した結果、弓状動脈の

血流量は BPS 投与前と比べて有意に増加した [83, 85]。本試験において、供試ネコの BPS に対する高感受性反応と思われる血圧の不変動と用量依存性の心拍数増加は、腎臓への血流量増加による代償性反応の可能性がある。そして sCr 値の低下は腎血流量増加による糸球体濾過量 (GFR) の増加による可能性がある。また、これらの BPS 投与時の反応は投与後 2 時間で速やかに基のレベルに復するが、12 時間間隔の投与で用量依存性に sCr 値が低下することから、腎臓機能への効果は持続していたと思われる。少なくとも sCr 値の増加が認められる CKD に対しては BPS が示す本作用は、好ましい反応であると考えられる。ただし、本研究において休薬期間中に sCr の再増加傾向が示されたため、臨床において効果持続には BPS の連日投与が必要と思われる。

腎臓の検査項目の効果と異なり、BPS 投与による供試ネコの AST 低下効果は、休薬期間中も正常値範囲内で低値を維持したことから肝臓での効果は sCr や BUN よりも持続的である傾向がうかがえた。また BPS 投与開始時点で相対的に AST 値が高い個体が、そうでない個体よりも低下率が大きい傾向が認められた。対 Vehicle 群比較で有意差を検出できなかったのは、投与開始時での ALT 値のバラツキによるものと思われる。肝臓への BPS の影響は、ネコ以外にラット、イヌおよびヒトにも共通して見られる。すなわち健常ラットでは比較的 low 用量から用量依存的な BPS の AST ならびに ALT の低下作用が出現する [75]。さらに健常イヌでも、試験開始時の AST ならびに ALT 値が相対的に高値の個体では BPS 投与後に明確にこれらの値が低下している [23]。BPS による AST ならびに ALT の低下作用がラット、イヌ、ネコおよびヒトの全ての種で共通か否か、結論を得るにはさらに検討が必要である。また、正常範囲内であるが初期値が高めの AST ならびに ALT 値が認められる個体に対

し、BPS がこれらの検査値を選択的に低下させる傾向について肝臓機能に対する改善効果ともいえるが、今後の検討課題である。

本研究における健常ネコでの有害事項として BPS の 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. (140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 投与で発現した消化器系の症状である下痢、嘔吐および BPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. (200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 投与で発現した消化器系の症状である下痢、嘔吐そして中枢神経系の症状である鎮静が挙げられる。有害事項の発現時の BPS 用量は、序文で推定したイヌの有害事項に類似していた。一方、ラットとヒトでの消化器系の有害事項誘発には、それぞれ 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ [75], 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ [30]の投与を要し、紅潮出現反応の投与量に比べれば、高用量 BPS が必要である。すなわち相対的にみてこれらの有害事項出現ではネコおよびイヌは高感受性であり、ラットおよびヒトは低感受性といえる。ネコおよびイヌの場合、相対的に皮膚の末梢血管より内臓血管に血液配分が多ければ肝臓、腎臓への好ましい影響も生じるが、副作用も生じやすい関係である。ヒトでは顔面紅潮に加え頭痛も問題となる副作用であるが、ネコにおけるこれらの有無に関する判定は非常に困難である。ネコでは鎮静反応の一部が頭痛症状であるかもしれない。ただ実際上はネコの鎮静も下痢、嘔吐と同じ用量から出現するため特に投薬において頭痛の在否が問題とはならない。また、これらの有害事項は他の動物およびヒトと同様に BPS 投与の中止により速やかに消失する。

本試験における BPS の腎臓機能に対する効果では、用量依存性に sCr を低下させた。BPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の単日投与では心拍数、血圧には変化が認められず、7日間の連日投与においても sCr、BUN 値に変化が認められなかった。このことから腎臓機能に対する BPS の効果は、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. 以上が必要であると判断した。BPS70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. 7日間の連日投与において有害事項が発生した。

しかし、BPS70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の単日投与では、有害事項は発生しておらず連日投与2日目以降であったこと、70ならびに100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の連日投与において6日目以降は、有害事項が減少していること、さらに連日投与7日目では70ならびに100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ において有害事項が発生していないことから、BPSを連日投与することで生体がBPSに対して順応しているようにも見える。BPSをCKDネコに対して臨床応用する際に、安全性と有効性を考慮すると経口的な連日投与可能量は、30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ (60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) であると結論した。

小 括

健常なネコに BPS を 10, 30, 70, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で, 単日投与および休薬期間を設けながら 1 日 2 回, 7 日間の連日投与を実施し, BPS 投与時における腎臓機能への有効性および血液, 血行動態および有害事項の出現を観察して健常ネコにおける BPS の安全な経口投与量の設定を検討した。

1. BPS の 10 および 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の単回経口投与および 7 日間の連日経口投与では全ての供試ネコで臨床症状の変化は, 認められなかった。BPS の 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ 7 日間連日投与において散発的な下痢が認められ, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ 7 日間連続投与において全ての供試ネコで軽度の嘔吐, 下痢, 鎮静が発現した (Table-1)。これらの反応は短時間で消失する一過性のものであり, 12 時間後の次回投与までには完全に消失し, 食欲減退なども認められなかった。試験期間中に BPS 投与による体重の増減は Vehicle 群に対する比較においても BPS 群における BPS 投与前後での比較においても認められなかった (Table-2)。
2. BPS の各投与量の単日投与において血圧は収縮期圧, 拡張期圧および脈圧ともに有意な変化は認められなかった (Table-4)。
3. BPS の各投与量の単日投与において心拍数の有意な増加が 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPS の単独投与で出現し増加率は用量依存性であり, 投与量によらず最大反応は投与後 0.5 時間目であり, その後速やかに投与前の値に復した (Table-3) (Fig-2)。
4. BPS の 7 日間連日投与で各投与量において血球数および血液中 Na, K, Cl 濃度への影響は認められなかった。

5. BPS の 7 日間連日投与で BPS 投与群は用量依存性に sCr 値および BUN 値を低下させた。sCr および BUN は低下した数値が休薬期間中に再増加するため、臨床において効果持続には BPS の連続投与が必要と思われた。
6. BPS の 7 日間連日投与で BPS 投与群は Vehicle 群と比較した場合 AST, ALT 値は有意な変動を認めなかった。しかし、BPS 投与群内での比較では AST 値は低下し、BPS 投与および休薬中の両期間を通じて AST 値を維持した。ALT 値についても BPS 投与群内では AST 値と同様に低下傾向がみられ、sCr 値、BUN 値とは異なり共に休薬期間中に再上昇する傾向は認められなかった。

以上の結果から健常ネコにおける BPS の腎臓機能への有効性を確認し、安全に経口投与できる投与量を 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$ と結論した。

第 IV 章

慢性腎臓病ネコに対するベラプロスト ナトリウムの予備的研究

序 文

慢性腎臓病 (CKD) は進行すると末期の腎不全に至り、尿毒症を併発する。尿毒症は腎臓機能低下による尿毒症物質の蓄積と考えられ、食欲低下や運動機能低下さらに脳を含む全身の臓器機能障害により死亡する。ヒトにおける尿毒症については CKD が進行すると薬物療法から透析療法に移行するため、腎不全患者は尿毒症症状に乏しい。また、ラットやマウスの腎臓病モデル動物においても尿毒症の判定が困難であるため、ベラプロストナトリウム (BPS) の尿毒症に対する効果について明らかではない。第Ⅲ章において健常ネコに対して BPS は 1 日 2 回、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) まで安全に連日経口投与できることを報告した。第Ⅳ章では BPS を CKD ネコに対して臨床応用する際に、健常ネコを用いて設定した BPS の投与量が自然発症 CKD ネコに対して安全であるか、BPS の CKD ネコに対する安全性と有効性および BPS の尿毒症に対する有効性について評価した。

材料および方法

BPS の尿毒症に対する有効性の評価は血液検査および臨床症状により検討した。血液化学検査において sCr と BUN が腎臓機能の一般的な指標として使用されることから両項目を用いて腎臓機能を評価した。

1. 供試動物と背景 (Table-1)

供試ネコの背景について Table-1 にまとめた。

IRIS の分類で Stage I ~ III の CKD ネコ 5 頭, 平均年齢 12.6 ± 5.31 歳齡 (範囲: 5 ~ 20 歳齡) を対象とした。平均体重は $4.48 \text{ kg} \pm 0.54 \text{ kg}$ (範囲: 3.7 ~ 5.2 kg) であり全て日本猫系の雑種であった。

NO 1. 2 年前から腎臓機能低下が認められ活動性低下, 食欲低下, 日常的に便秘が認められていた。入症時の IRIS 分類は Stage II であった。

NO 2. 2 ヶ月前から糖尿病の治療で中間型持続性インシュリン 2 単位 bid (NPH インスリン, 山之内製薬株式会社, 東京) を開始し試験期間中も継続治療した。また同時に糖尿病に伴う細菌性膀胱炎の治療を実施するが試験開始 1 週間前に治療は終了した。試験前および試験期間中は, 尿糖 (±) で安定維持していた。試験開始 1 週間前まで 20 日間, 経口吸着剤クレメジン $200 \text{ mg} \times 2/\text{day}$ (コバルジン, ノバルティス アニマルヘルス株式会社, 東京) を投与するが, 臨床症状改善せず投与を中止した。IRIS 分類は Stage I であるが, 持続的な尿蛋白質 (30 mg/dl) が認められ, 糖尿病が安定しているため入症とした。

- NO 3. 1年前から腎臓機能低下（IRIS 分類 Stage II）するが放置し食欲と活動性が低下していた。
- NO 4. 2年前から腎臓機能が徐々に低下（IRIS 分類 Stage II）するが、食欲および活動性は比較的安定していた。
- NO 5. 数か月前から重度の便秘を呈していた。食欲および活動性が低下し、ていた。入症時の IRIS 分類は Stage III であった。

2. 入症基準

尿検査試験紙で尿蛋白質 1+以上（30 mg/dl 相当）、尿比重の低下（USG:< 1.035）、sCr \geq 1.6 mg/dl のいずれかが持続している、もしくは全てを満たしているネコを選択した。尿蛋白質の検出は尿検査試験紙（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社、東京）を、尿比重の測定は動物用の尿比重計（株式会社アタゴ、東京）を用いた。sCr の測定は臨床検査機関（福山臨床検査センター株式会社、広島）に依頼して測定した。

3. 除外基準

急性腎臓障害、急性および慢性の循環器障害、慢性尿路疾患、重度の肝臓障害、悪性腫瘍、FIV（Feline immunodeficiency virus）陽性、FeLV（Feline leukemia virus）陽性、FIP（Feline infectious peritonitis virus）陽性のネコを除外した。

4. 併用禁止薬ならびに併用制限薬と制限した治療法の理由

試験期間中は腎臓機能に影響を与える可能性がある薬剤であるドパミン、フロセミドをはじめとした利尿薬、NSAID (Nonsteroidal anti-inflammatory drug)、ビタミン D サプリメント、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) およびアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) の投与は禁止とした。脱水症状の緩和目的で一時的な水分補給のための輸液との併用は可能とした。処方食および食事は BPS 投与前から継続的に摂取しているものについては可能とし、試験開始後の食事内容の変更および処方食の変更は不可とした。

5. ベラプロストナトリウム製剤

1錠中に 150 μg の BPS を含む薬剤は、TORAY (東レ株式会社, 東京) より入手した。

6. BPS の投与量と投与方法

第Ⅲ章で健常ネコに対する BPS の安全な経口的、連日投与可能量は、BPS 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. (60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) であり、BPS 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. (140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) から有害事項が発現する結果が得られたので本試験では飼主に危険性と効果を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た。試験に入る前に少なくとも 2 回の予備検査を実施し、病態の安定と入症基準を満たしていることを確認した後に、BPS 150 $\mu\text{g}/\text{head}$ を 12 時間間隔で 1 日 2 回の経口投与を行った。投与期間は 180 日間の連日経口投与とした。

7. 尿毒症の評価 (Table-2)

臨床症状による尿毒症の評価において尿毒症の症状は多彩であるが、食欲の有無は尿毒症の最も重要な指標である。そして食欲低下は最も一般的で深刻な尿毒症症状のひとつとして、CKD ネコの約 50 %に発現すると報告されている[14]。さらに CKD の進行と共に活動性の低下も見られることから食欲と活動性を尿毒症症状の指標として用いた。また、食欲低下に伴って生じる体重の減少は CKD ネコの全身状態の悪化をよく反映し、CKD の予後を示す客観的な指標であることから体重の変化を評価項目とした。

食欲の評価は健康時の摂食量を 100 %とし、それに対する摂食量の割合を%で示しスコア(0~3)で表した。すなわち食欲廃絶= 0(健康時の約 5 %), 顕著な食欲低下=1(約 25 %), 食欲低下 = 2(約 50 %), 正常な食欲= 3(約 100 %)とした。活動性評価は健康時の活動性を 100 %として以下の基準で行った。重度な鎮静=0(健康時の活動性の 5 %), 中程度の活動性低下=1(約 50 %), 正常な活動性= 2(100 %)。両指標を合計したものを、尿毒症症状を評価する臨床スコアとし、満点を 5 ポイントとして評価した(Table-2)。ポイントは毎月の検査来院時における飼い主からの聴取内容と診察による直接観察によって決定した。体重は来院時に測定した。

8. 血液学的検査の予備試験

血中の検査値が食事の影響により変動することが知られている[27, 65]。BPS の尿毒症に対する有効性を評価するにあたり、血液学的検査において健

常ネコ 5 頭と IRIS 分類による Stage II の CKD ネコの食後の sCr, BUN, AST, ALT を 4 時間間隔で 20 時間測定した。

9. 血液学的検査

BPS 投与後 8~12 時間に来院し、頸静脈から採血した血液を血液検査および血液化学検査に用いた。

RBC, WBC, PLT, Hb の測定は自動血球計算機（セルタック MEK-5258, 日本光電株式会社, 東京）にて実施した。第 IV 章では第 III 章での血清化学検査項目に栄養的評価の項目として TC を追加し, 腎臓機能の評価のために Ca, IP を追加し, 供試ネコに糖尿病治療中の CKD ネコが含まれるため B.G を追加項目とした。TP, TC, AST, ALT, Alkaline phosphatase (ALP), Total bilirubin(T.Bil), sCr, BUN, Calcium (Ca), Inorganic phosphorus (IP) および Blood glucose (B.G) は, 臨床検査機関（福山臨床検査センター株式会社, 広島）に依頼して測定した。

10. 有害事項

健常ネコに高用量の BPS を投与した際に推定される有害事項は嘔吐, 下痢, 鎮静であることから飼い主に事前に注意を促した。試験開始後これらの項目を含めた有害事項発現の有無について, 1 ヶ月毎の来院時にその発生の有無を飼い主から聴取して記録した。

11. 統計解析

試験治療を受けた全てのネコを安全性解析の対象（安全性解析対象）に含めた。データは平均値±標準偏差で示した。解析は JMP ver.5（SAS Institute Japan, 東京）により実施し、BPS の投与前と 6 ヶ月後の値を Wilcoxon signed-ranks test によって比較した。p 値が 0.05 未満（あるいは 0.05<）の場合には有意差ありと判定した。

Table-1 Background of the CKD cats

Cat No.	ST	Y	SEX	B.W kg	sCr mg/dl	BUN mg/dl	Upro mg/dl	USG
1	II	5	M	5.2	1.87	30.8	30	1.030
2	I	11	M	4.7	1.54	39.2	30	ND
3	II	17	M	4.5	2.72	71.6	30	1.018
4	II	10	F	3.7	2.04	29.4	100	1.012
5	III	20	M	4.3	3.76	53.1	ND	ND
mean±SD		12.6± 5.31		4.48± 0.54	2.38± 0.78	44.8± 15.82	47.0± 30.31	1.02±0.007

ST : IRIS stage Y : age(years) BW : body weight Upro: urine protein
 USG: urine specific gravity M: male F: female ND: not dated

Table-2 Clinical score
appetite score

appetite	food intake (healthy=100%)	score
none	about 5 %	0
marked loss of appetite	about 25 %	1
loss of appetite	about 50 %	2
normal	about 100 %	3

performance	activity (healthy=100%)	score
coma	about 5 %	0
moderately poor	about 50 %	1
normal	about 100 %	2

appetite score + activity score = Clinical score : 0~5 points

成 績

1. BPS の投与量

供試ネコ 5 頭の体重は平均±SD : 4.48±0.54 kg (範囲 : 3.7~5.2 kg) であったため、BPS の投与量は 150 µg/head 平均±SD : 33.90±3.87 µg/kg (範囲 : 28.8~40.5 µg/kg) となった。

2. 血液学的検査の予備試験結果 (Fig-1) (Table-3)

健常ネコの食前の sCr 値 (平均±SD : 1.43±0.22) は食後 4 時間で最高値 (平均±SD : 2.16±0.35) に有意 ($p=0.031$) に増加し、8~10 時間後に基に復した。CKD ネコの食前の sCr 値 2.98 mg/dl は食後 4 時間から 8 時間で最高値 3.54 mg/dl に達し、その後減少に転じたが健常ネコに見られた減少幅よりも変動が少なく高値が持続し 20 時間後に基に復した。健常ネコの食前の BUN 値 (平均±SD : 21.56±4.51) は食後 12 時間で最高値 (平均±SD : 32.84±5.03) に有意 ($p=0.031$) に増加し、20 時間後に基に復した。CKD ネコの食前の BUN 値 51.2 mg/dl は食後 10 時間から 12 時間で最高値 62.6 mg/dl となり、20 時間後に基に復した。健常ネコの食前の AST 値 (平均±SD : 37.2±13.23) と食後 8 時間の最高値 (平均±SD : 39.2±12.51) を比較したが変動を認めなかった ($p=0.43$)。健常ネコの食前の ALT 値 (平均±SD : 62.2±22.40) と食後 8 時間の最高値 (平均±SD : 63.2±21.83) を比較したが食事による変動は認めなかった ($p=0.31$)。CKD ネコの AST, ALT 値は、健常ネコと同様に変動を認めなかった。

3. 尿毒症と有害事項 (Table-4)

臨床症状の評価において食欲の評価は4段階に分類し、活動性の評価は3段階に分類した。食欲評価は摂食した食事量を計ることで客観的に分類することができるが、活動性の評価は飼い主の主観的な評価によるため大まかに分類した。

BPS 投与後における臨床症状の変化は、早期に認められた供試ネコで BPS 投与 2 日から、遅いネコでも BPS 投与 5 日には顕著な食欲と活動性の改善が認められた。NO 1 および 5 において BPS 投与直後から便秘は解消した。特に重度の便秘を呈した NO 5 は、BPS 投与 2 日から食欲は向上し、1 ヶ月後にはスコアが満点の 5 までに改善した。NO 1 ならびに 5 の活動性および食欲は BPS 投与期間を通じて維持できた。また、全ての症例において BPS 投与期間中は消化管運動の低下は認められず、排便は毎日生理的に見られた。BPS 投与 60 日目には全ての供試 CKD ネコでスコアが満点の 5 となり投与前値に比べ有意に改善 ($p=0.0313$) し、180 日においても全ての供試 CKD ネコが満点のまま維持した。BPS の投与前後の食欲と活動性のスコアは 2.4 ± 0.48 へと改善した ($p=0.0313$)。全ての供試 CKD ネコで、投与期間中は輸液を含む併用薬治療および処方食の変更は実施しなかった。

この試験期間中に BPS 投与を原因とする有害事項は認められなかった。全ての供試 CKD ネコで 180 日間の BPS 投与が完遂された。

4. 体重の変化 (Table-4)

Table-4 に全供試 CKD ネコの体重の変化をまとめた。BPS の投与により 5 頭の平均体重は投与前の 4.48 ± 0.54 kg から 60 日には 4.80 ± 0.47 kg, 180 日には 5.04 ± 0.62 kg へと増加した。初期値 (baseline value) からの体重変化では試験開始から 30 日で初期値に対して体重は増加傾向 ($p=0.0625$) となり 60 日で有意差 ($p=0.0313$) が認められ, その後 180 日まで有意差が認められた ($p=0.0313$)。

5. 血液学的検査値の推移 (Table-5)

Table- 5 に全供試 CKD ネコの各種血液項目に対する結果をまとめた。

NO 2 において BPS 投与前の白血球数が $21,200 /\mu l$ と高値であったが徐々に低下し, Day 180 の BPS 経口投与終了時には, 正常値範囲内 $9,100 /\mu l$ に回復した。その他の症例の血球数の有意な変動は, 認められなかった。

血液化学検査において, BPS 投与前後の各検査項目について有意差を求めた。腎臓機能の指標である sCr 値は, BPS 投与前 (平均 \pm SD: 2.38 ± 0.78 mg/dl) が 180 日投与後には (平均 \pm SD: 2.48 ± 1.20 mg /dl) になったが, 有意な変化ではなかった ($p=0.3125$)。BUN においては BPS 投与前の (平均 \pm SD: 44.8 ± 15.82 mg/dl) が 180 日投与後に (平均 \pm SD: 55.0 ± 32.80 mg/dl) に変化した, これも統計的な有意差は認めなかった ($p=0.3125$)。第 III 章で BPS 投与後に肝酵素の低下が認められたため複数の肝臓機能障害の指標 (AST, ALT, ALP, T. Bil) について調査した。AST 値は, BPS 投与前後に有意な差は認められなかった ($p>0.9999$)。また他の投与前後の有意差検定においても ALT 値 ($p=0.8927$), ALP 値 ($p=0.6845$), そして T. Bil 値 ($p=0.125$) であり, 有意な変化を認めなかった。すなわち BPS を投与した 180 日間は, 肝臓機能障害の

いずれの指標についても有意な変動は、認められなかった。TP 値においても有意な変動は見られなかった ($p > 0.9999$)。TC 値においては全ての供試 CKD ネコで BPS 投与後に増加した。TC 値は投与前 (137.8 ± 32.4 mg/dl) に対し、投与後 (151.6 ± 35.19 mg/dl) の比較では有意差が認められた ($p = 0.0313$)。Ca 値は有意な変化は見られなかった ($p = 0.25$)。IP 値は投与前 (平均 \pm SD : 4.0 ± 0.87 mg/dl) と比較し 30 日 (平均 \pm SD : 4.8 ± 1.30 mg/dl) では有意差 ($p = 0.013$) が見られたが、180 日投与後 (平均 \pm SD : 4.6 ± 1.38 mg/dl) であり有意差は認められなかった ($p = 0.0625$)。BG 値において NO 2 の BG 値が 36 mg/dl と低値あった。CKD ネコ 5 頭の BG 値において BPS 投与前の (平均 \pm SD : 87.8 ± 12.41 mg/dl) が 180 日投与後に (平均 \pm SD : 75.0 ± 23.87 mg/dl) に低下したが、有意な変化ではなかった ($p = 0.4063$)。NO 2 を除いた 4 頭で解析すると、BPS 投与前 (平均 \pm SD : 83.2 ± 8.22 mg/dl) であったが 180 日投与後に (平均 \pm SD : 86.2 ± 16.31 mg/dl) となり変化はなかった ($p = 0.4375$)。したがって BG 値における有意な変化は、見られなかった。

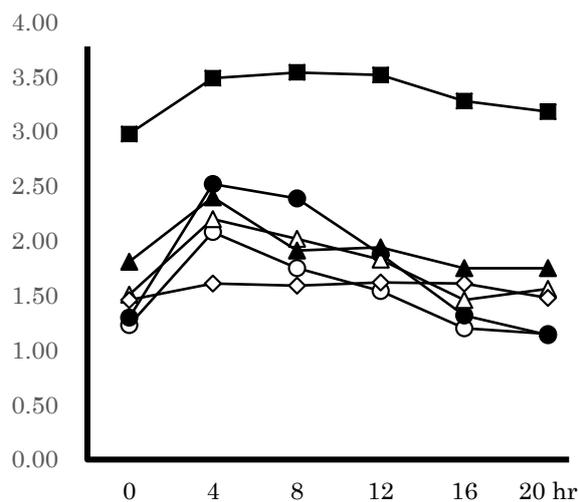
6. 有害事項 (Table-4)

CKD ネコ 5 頭に対して BPS を 150 μ g/head 1 日 2 回で 180 日連日経口投与したが、この投与量の平均値 33.90 ± 3.87 μ g/kg (範囲 : 28.8 ~ 40.5 μ g/kg) は、第 III 章で示した健常ネコで 1 日 2 回の安全な連日投与が可能であった 30 μ g /kg を上回ったが、有害事項の発現は認められなかった。

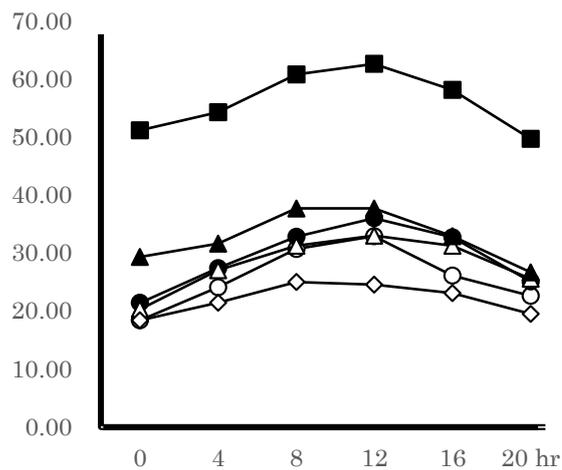
Table-3 Changes of the sCr, BUN, AST and ALT value after the feeding.

	0 hr	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr	20 hr
sCr(mg/dl)	1.43±0.22	2.16±0.3*	1.93±0.30	1.76±0.17	1.46±0.22	1.41±0.26
CKD	2.98	3.49	3.54	3.52	3.28	3.18
BUN(mg/dl)	21.56±4.51	26.3±3.82	31.5±4.55	32.84±5.*	29.22±4.39	23.9±2.88
CKD	51.2	54.3	60.8	62.6	58.1	49.7
AST(U/L)	37.2±13.23	38.4±12.09	39.2±12.51	35.2±12.21	33.2±9.09	31.6±8.56
CKD	37	33	33	33	31	29
ALT(U/L)	62.2±22.40	62.2±22.79	63.2±21.83	59±20.76	59±19.93	58.2±19.56
CKD	34	31	31	31	32	33

hr: hour Data are shown as mean±SD. *p<0.05 in comparison between baseline values in the analysis population by Wilcoxon's signed – rank test. sCr p=0.0313 BUN p=0.0313. There were not significant differences in the values of AST and ALT compared with baseline values.



—○— 1 —●— 2 —△— 3 —▲— 4 —◇— 5 —■— CKD
sCr



—○— 1 —●— 2 —△— 3 —▲— 4 —◇— 5 —■— CKD
BUN

Fig-1 The changes of sCr and BUN values after the feeding. Serum sCr value of health cats reached the highest value at 4 hours after the feeding, and BUN reached the highest value at 12 hours. Serum sCr value of CKD cat reached the highest value at 8 hours after the feeding, and BUN reached the highest value at 12 hours.

Table-4 The changes of clinical scores and body weight during BPS administration and presence of adverse events.

day	0	30	60	90	120	150	180
score	2.6 ± 0.48	4.8 ± 0.4	5 ± 0*				
B.W	4.48 ± 0.54	4.68 ± 0.51	4.80 ± 0.47*	4.92 ± 0.53*	4.77 ± 0.50*	5.33 ± 0.51*	5.04 ± 0.62*
A.E		—	—	—	—	—	—

B.W: body weight (kg) A.E: adverse event — : no adverse event
 Data are shown as mean ± SD. *: There is a significant difference (p<0.05) between baseline value and the values of each observation point analyzed by Wilcoxon's signed – rank test.

Table-5 The effects of BPS administration on the findings of blood examination.

	day	Day of BPS administration						
		0	30	60	90	120	150	180
RBC	($\times 10^6/\mu l$)	7.33 \pm 1.63	6.92 \pm 1.73	7.20 \pm 1.48	7.01 \pm 1.85	6.44 \pm 2.51	6.97 \pm 1.13	7.09 \pm 2.33
WBC	($\times 10^3/\mu l$)	12.60 \pm 6.11	11.50 \pm 6.34	11.16 \pm 4.63	8.16 \pm 4.57	8.52 \pm 3.37	13.63 \pm 1.01	9.32 \pm 4.13
Hb	(g/dl)	11.0 \pm 2.24	11.0 \pm 2.52	10.9 \pm 2.27	11.0 \pm 2.45	10.1 \pm 2.99	11.8 \pm 1.65	11.0 \pm 2.65
PLT	($\times 10^4/\mu l$)	8.45 \pm 2.98	9.54 \pm 2.77	8.54 \pm 2.73	10.47 \pm 2.84	10.38 \pm 2.40	10.87 \pm 3.39	9.86 \pm 3.82
TP	(g/dl)	7.6 \pm 0.32	7.5 \pm 0.30	7.6 \pm 0.19	7.4 \pm 0.24	7.5 \pm 0.43	7.3 \pm 0.28	7.5 \pm 0.18
TC	(mg/dl)	137.8 \pm 32.4	147.6 \pm 30.43	153.4 \pm 25.81	156.4 \pm 35.72*	149.3 \pm 36.08	175.7 \pm 21.29	151.6 \pm 35.19*
sCr	(mg/dl)	2.38 \pm 0.78	2.66 \pm 1.36	2.44 \pm 1.20	2.49 \pm 1.21	2.57 \pm 1.03	2.61 \pm 1.57	2.48 \pm 1.20
BUN	(mg/dl)	44.8 \pm 15.82	50.4 \pm 29.11	47.6 \pm 26.43	50.1 \pm 26.36	56.0 \pm 23.88	54.0 \pm 30.55	55.0 \pm 32.80
AST	(U/L)	32.6 \pm 6.52	39.8 \pm 12.76	31.4 \pm 11.56	33.6 \pm 7.65	33.25 \pm 11.38	32.0 \pm 9.41	33.6 \pm 14.03
ALT	(U/L)	68.2 \pm 23.97	71.6 \pm 35.38	55.2 \pm 25.60	69.2 \pm 27.66	64.8 \pm 36.58	74.3 \pm 16.99	70.0 \pm 37.39
ALP	(U/L)	72.0 \pm 35.56	76.8 \pm 34.19	97.8 \pm 44.34	83.2 \pm 36.85	70.5 \pm 25.70	92.3 \pm 24.71	70.6 \pm 25.93
T.Bil	(mg/dl)	0.2 \pm 0	0.1 \pm 0.04	0.1 \pm 0.04	0.1 \pm 0.04	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.04	0.1 \pm 0.04
Ca	(mg/dl)	9.7 \pm 0.44	9.7 \pm 0.40	10.0 \pm 0.43	9.6 \pm 0.36	9.5 \pm 0.08	9.9 \pm 0.32	9.8 \pm 0.34
IP	(mg/dl)	4.0 \pm 0.87	4.8 \pm 1.30*	4.7 \pm 1.36	4.6 \pm 1.33	4.9 \pm 0.78	4.6 \pm 1.23	4.5 \pm 1.33
B.G	(mg/dl)	87.8 \pm 12.41	104.4 \pm 35.51	101.4 \pm 19.69	128.0 \pm 79.70	130.3 \pm 69.16	120.0 \pm 40.62	75.0 \pm 23.87

Data are shown as mean \pm SD. *: There is a significant difference ($p < 0.05$) between baseline value and the values of each observation point analyzed by Wilcoxon's signed – rank test.

考 察

第IV章ではBPSのCKDネコに対する安全性と有効性ならびに尿毒症に対する有効性を血液学的検査と臨床症状から評価した。

血液学的検査の信頼性を増すために腎臓機能の指標であるsCr, BUNと肝機能障害の指標であるAST, ALTの食事による血中濃度の変動を測定した。その結果、健常ネコのsCr値は食前では正常範囲内(平均±SD: 1.43±0.22 mg/dl)であったが、食後4時間において最高値(平均±SD: 2.16±0.3 mg/dl)に達し健常ネコの全頭がIRIS分類のStage IIまで上昇した。CKDネコのsCr値は食前2.98 mg/dl (IRIS分類のStage III)から食後8時間で最高値3.54 mg/dl (IRIS分類のStage III)に増加した。AST, ALTについては健常ネコおよびCKDネコの食事からの影響は少なかった。CKD (IRIS分類のStage III)においては、sCr, BUN, およびAST, ALT値の食事による変動は軽度であった。しかし、健常ネコについては腎臓機能の指標であるsCrは、食後4時間は上昇するため上昇時に採血するとCKDネコと誤認する危険性があり採血は、食後8~12時間の絶食として行うことが必要であった。

血液学的検査においてNO 2のWBCの上昇が認められたが、白血球数の上昇の原因としてNO 2では2ヶ月前に糖尿病による膀胱炎を併発し抗生剤による治療を受けBPS投与開始前には治療は終了していたが、膀胱炎の影響が残存していたと思われる。またNO 2は、BPS投与終了時にBG値が36 mg/dlと低値であったが、糖尿病治療のために中間型持続性インシュリン2単位bid (NPHインシュリン, 山之内製薬株式会社, 東京)で継続治療しているため採血前は、8時間の絶食としたためBG値が低値であったと思われる。

本試験の投与量設定において第Ⅲ章では BPS を健常ネコに対して 1 日 2 回の連日投与が可能で安全な投与量は、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で有害事項が発現することを報告した。

BPS 投与において健常ネコでは、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の安全域から 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の副作用域までの範囲が広いため、第Ⅳ章では BPS を CKD ネコに対して投与する際の安全域の確認を目的として供試 CKD ネコに対して広い範囲の投与量設定を行い安全性と有効性を評価した。

経験値であるが一般的なネコの体重 (2~5 kg) を基礎に安全域である 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から副作用域である 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までを網羅する投与量の設定を行った。体重の重い 5 kg のネコに安全域の 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を乗じると 150 $\mu\text{g}/\text{head}$ となり、150 μg を体重の軽い 2 kg のネコで除すると 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となる。供試 CKD ネコに対する BPS 投与量は、30~75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となり安全域から副作用域までを網羅できる。これを考慮して本試験での BPS 投与量を 150 $\mu\text{g}/\text{head}$ に設定した。経験値であるが平均的なネコの体重を 4 kg とすると BPS 投与量は 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となり有害事項の発現は少ないであろうと判断した。しかし、2 kg 程度の CKD ネコが供試された場合、BPS 投与量は 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるため、有害事項が認められる可能性があった。本試験では供試ネコ 5 頭の体重は平均 \pm SD: 4.48 \pm 0.54 kg (範囲: 3.7~5.2 kg) であり、BPS 投与量の平均値 33.90 \pm 3.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (範囲: 28.8~40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) であったため有害事項は、認められなかった。

本試験において自然発症 CKD のネコに対して BPS150 $\mu\text{g}/\text{head}$ を 1 日 2 回連日経口投与したところ尿毒症症状 (食欲および活動性低下) を 30 日以内に改善し、180 日間維持されることが初めて示された。尿毒症症状の改善は体重増加という全身状態を示す所見と血液生化学検査で TC 値の増加という客

観的な指標の改善を伴っていた。これまでの研究では他の動物種においても BPS 投与によって体重の増加を伴う尿毒症症状の改善をもたらすことは、知られていない。

本試験での顕著な臨床スコアの改善のメカニズムについては、今回の検討の範囲では明らかではない。尿毒症の原因はいわゆる尿毒症物質の蓄積によると考えられるが、その全貌は未だ明らかではない。低分子 (<300 dalton) から高分子 (300~15,000 dalton) までの多数の化合物が候補に挙げられており尿毒症は単一の物質の蓄積ではなくこれら複数の物質の作用で発現すると考えられている [9]。

腎臓機能の指標である sCr 値および BUN 値について BPS を投与した 180 日間は、有意な変動は認められなかった。供試 CKD ネコに対して投与した BPS の投与量は、(平均±SD : 33.90±3.87 µg/kg) (範囲 : 28.8~40.5 µg/kg) であった。BPS の投与期間である 180 日間は、腎臓機能の低下を抑制し腎臓機能が維持されと評価した。

尿毒症物質の排泄において腎臓の果たす役割は当然ながら大きく、腎臓機能の改善が本試験における顕著な臨床スコアの改善に寄与した可能性がある。しかしながら腎臓の濾過機能の指標である sCr や BUN については、BPS 投与によっても有意な変化は認められなかった。しかし、sCr 値の低下が認められずとも GFR の改善の可能性があるため、今後は、sCr や BUN 以外の鋭敏なクリアランス試験あるいは GFR マーカーで検討する必要があると考える。さらに臨床スコアの改善に腎臓尿細管から尿毒症物質の直接排泄の亢進が寄与した可能性がある。すなわち尿毒症物質の血中からの排泄は糸球体からの濾過によるだけでなく、尿細管および尿細管周囲毛細血管に分布する各種薬物トランスポーターを介して、直接排泄されることが知られている [92]。

CKD においては比較的早期からこれらの薬物トランスポーターの障害が生じる, それが尿毒症物質の蓄積をもたらす腎臓機能のさらなる低下につながる事が報告されている[93]。BPS は造影剤や NSAIDS 等の薬剤による尿細管障害を軽減する[103]ことが報告されており, 尿細管障害を直接抑制あるいは改善することで尿毒症物質の排泄に寄与した可能性がある。

他の可能性として, 肝臓機能の改善が臨床症状の改善に寄与した可能性がある。CKD 動物モデルにおいて尿毒症物質によって肝臓の薬物代謝に関与する酵素や薬物トランスポーターの出現や活性が障害される可能性が指摘されている[60]。BPS は各種の肝臓障害モデル動物において肝臓障害の抑制に有効である [4, 18, 35, 36]。ネコにおいても摘出灌流肝臓において PGI₂ による肝臓障害予防効果が認められ肝細胞リソソーム安定化によるものとされている[36]。これらの事から CKD ネコへの BPS の投与により, 低下した肝臓での薬物代謝関連酵素の発現や活性の低下を抑制した可能性がある。ただし, 今回の検討では直接的肝機能障害の指標ではないものの AST, ALT, ALP, T. Bil については, BPS 投与前後で特に変化は認められていないため, 本仮説を検証するためには, 肝臓の薬物代謝機能を定量評価する必要があるものと思われる。

本試験では TC 値の有意な増加が認められた。一般的に TC 値の増加は, 食事性の外因性コレステロール摂取量の増加によるものと考えられている。一方, コレステロールは肝臓で 80 % が生成されており, 肝臓での生成量の増加も一因として考えられる。肝臓での生成量は外因性コレステロール摂取量により調整されており摂取量が低下した場合に肝臓内での生成量が増加する。しかし, その場合は, 体重は減少する。本試験において食欲は全ての症例で増加しており, AST, ALT, ALP, T. Bil 値に変動が認められないことから

TC 値の増加は、食欲増加による食事性の外因性コレステロール摂取量の増加によるものと判断した。

一方で、BPS を投与した CKD ネコ 5 頭は、臨床症状が早期では BPS 投与後 2 日から改善が認められ、遅いネコでも投与後 5 日には顕著な食欲と活動性の改善が認められた。ヒトの CKD の患者は水分制限（脱水）や食事制限、薬剤の影響などで便秘を生じやすく [6]、本試験の供試ネコにおいても BPS 投与前に便秘が認められた。CKD においては腸管細菌由来の尿毒症物質であるインドキシル硫酸、P-クレジル硫酸、トリメチルアミン-N-オキシド (TMAO)、エンドトキシンなどの尿毒症物質が腸管内に蓄積し [97]、それらが吸収され全身循環に流入することで腎臓を含めた各臓器に障害を与え、尿毒症症状などを進展させることが明らかになっている [45, 71, 86, 87]。

BPS は、イヌ摘出血管（中大脳動脈、椎骨動脈、冠動脈、腸間膜動脈、腎動脈、大腿動脈）において用量依存性に血管を弛緩させる [1]。その中でも腸間膜動脈は最も BPS に対して感受性が高く、比較的 low 濃度で血管が弛緩する [1]。

第 III 章で健常ネコに BPS を段階的に 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで増量した際に 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では有害事項は発現せず 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 6 頭中 4 頭、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では全頭に下痢、嘔吐などの消化器症状が発現した。この結果から BPS は用量増加によって消化管運動を促進させると考えられる。本試験での BPS 投与量の（平均 \pm SD : 33.90 \pm 3.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（範囲 : 28.8 ~ 40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）は第 III 章で示した健常ネコで 1 日 2 回の安全な連日投与が可能であった 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を上回ったが、下痢や嘔吐などの消化器症状は発現しなかった。したがって本試験で供試ネコ 5 頭に投与した BPS 投与量の（平均 \pm SD : 33.90 \pm 3.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（範囲 : 28.8 ~ 40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）は、消化管運動を促進するが下痢を発現するまでの投与量で

はないと推測される。これらから BPS は消化器運動を促進し CKD にみられる消化器運動の低下による便秘を改善した可能性がある。本試験において飼主からの聴取では排便は BPS 投与開始直後から毎日確認しており、消化管運動の改善を裏付けるものである。CKD では腎臓機能低下および消化管運動の低下による尿毒症物質の二重の蓄積リスクを生じる。そのため、BPS 投与による消化管運動の改善は、尿毒症リスクの一つである腸管に蓄積した尿毒症物質の排除を促し、尿毒症症状を改善するという大きな利点となりえる。また BPS による二次的な効果として消化管運動の適度な促進は、食欲の増進に関与している可能性がある。また本試験でみられた BPS 長期投与による生理的な排便の継続は、尿毒症物質蓄積のリスクを軽減させ食欲増進や活動性の向上などの QOL の向上に関与した可能性がある。

本試験において尿毒症症状の改善は、体重増加と TC 値の増加という客観的な指標の改善を伴っており有意な改善を示した。また本試験において BPS 投与による消化管運動の促進が、尿毒症症状の改善に関与した可能性が示唆された。しかし、今回の検討の範囲では BPS 投与による臨床症状改善のメカニズムは明確ではなく今後の詳細な検討が必要である。

小 括

BPS の自然発症 CKD ネコに対する臨床応用を目的として、BPS の CKD ネコへの安全性と腎臓機能への有効性および BPS の尿毒症に対する有効性を検討した。その結果、以下の知見が得られた。

1. 供試 CKD ネコ 5 頭に対して BPS を $150 \mu\text{g}/\text{head}$ (平均 \pm SD: $33.90 \pm 3.87 \mu\text{g}/\text{kg}$, 範囲: $28.8 \sim 40.5 \mu\text{g}/\text{kg}$) 1 日 2 回で 180 日間の連日経口投与は可能であった。
2. 尿毒症症状 (食欲および活動性低下) を BPS 投与後 30 日以内に改善し、180 日間維持されることが初めて示された。尿毒症症状の改善は、体重増加という全身状態を示す所見と血液化学検査所見で TC 値の増加という客観的な指標の改善を伴っており、有意に改善を示した。他の動物種においても BPS 投与によって体重の増加を伴う尿毒症症状の改善をもたらすことは知られていない。
3. 血液化学検査項目において BPS を供試 CKD ネコに 180 日間、連日経口投与した結果、sCr 値および BUN 値に有意な変動は認められなかった。このことから供試 CKD ネコの腎臓機能は 180 日間維持され有効性を確認した。
4. 本試験で実施した血液化学検査項目の中で唯一 TC 値のみが有意な変動 (増加) を示した。本所見は、食欲増加による外因性コレステロール摂取量の増加によるものと推測された。
5. sCr 値, BUN 値および AST 値, ALT 値, ALP 値, T. Bil 値の変動を伴わない尿毒症症状の改善が認められた。

6. 尿毒症の改善には腎臓機能、肝臓機能とは独立した全く別のメカニズムが関与している可能性が示唆された。
7. CKD ネコに対する BPS 平均投与量（平均±SD:33.90±3.87 µg/kg, 範囲: 28.8~40.5 µg/kg）では、下痢などの消化器運動の亢進はなく消化器運動を促進維持し生理的な排便が可能であった。
8. BPS 投与による消化器運動の改善は、尿毒症リスクの一つである腸管での蓄積した尿毒症物質の排除を促進し、尿毒症症状を改善している可能性がある。その中でも食欲の増進にも関与していると考えられることから CKD ネコの QOL の向上に寄与できると思われる。
9. BPS の 180 日間の連日経口投与において血球数および血液化学検査項目への影響は認められなかった。

以上の様に供試 CKD ネコ 5 頭に対して BPS を 150 µg/head（平均±SD:33.90±3.87 µg/kg）1 日 2 回、180 日間の連日経口投与は、第Ⅲ章で示した健康ネコで 1 日 2 回の安全な連続投与が可能であった 30 µg/kg を上回ったが、安全性について特に問題を認めず尿毒症症状の改善が認められた。

第 V 章

慢性腎臓病ネコにおけるベラプロストナトリウムの 臨床効果の検討

序 文

現在の獣医学領域においてネコの慢性腎臓病(CKD)に対する治療はヒトのCKDに対する治療を参考として実施されている。しかし、ヒトとネコのCKDの臨床症状および病理組織学的所見は異なる。ヒトのCKDの病理組織学的所見は主に糸球体腎炎であるのに対して、ネコのCKDの病理組織学的所見は尿細管間質性腎炎である[7, 13]。ネコのCKDに対する基本的治療法は食事療法[68]であり、さらに進行したCKDの治療法は薬用活性炭による経口吸着療法[59]や輸液療法[74]が行なわれている。ヒトと同様にアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)[32, 47]やアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)[77]も使用されているが、その治療効果は必ずしも満足するものではない。このような背景からネコのCKDの病態に則した最適な治療薬の登場が望まれている。

そこで本研究はCKDネコに対するベラプロストナトリウム(BPS)の安全性と有効性そして臨床応用の可能性を評価する目的で行われたものである。まず第II章で新しく開発したPUU0解除ラットモデルを用いて、CKDネコの病因である尿細管間質性腎炎を作成し、BPSが病態である尿細管間質の線維化を著しく抑制することを病理組織学的に証明した[82]。プロスタグランジン系薬剤は動物種によりその感受性が大きく異なる[58]ことからBPSをCKDネコに臨床応用するにあたって、安全性の観点から投与量の設定が不可欠と考えられるが現在までその報告はない。そのため第III章では健常ネコを用いてBPSの安全性と腎臓機能に対する有効性の評価および投与量の設定を行った。その結果、BPSは腎臓機能の指標として用いられているsCrとBUNを用量依存性に低下させ腎臓機能への有効性が証明された。そしてネコへの臨床応用が可能であり安全な経口的、

連日投与可能量は $30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. であると結論した。次に第IV章では予備的研究として自然発症のCKDネコに対してBPS $150 \mu\text{g}/\text{head}$ を1日2回の180日間の連日経口投与をおこない、BPSの自然発症CKDネコに対する長期投与の安全性と有効性および尿毒症に対する有効性を評価した。自然発症CKDネコへの180日間のBPS投与期間中に有害事項は認められず安全性が証明された。またsCr値およびBUN値において有意な変動は認められず腎臓機能は維持された。また尿毒症に対してBPS投与初期から臨床症状は改善し投与期間中維持された。

第II章から第IV章までの結果を基に、第V章ではBPSを臨床応用することを目的として、自然発症CKDネコに対してプラセボを対象とするランダム化二重盲検比較試験を実施しBPSの安全性と有効性を評価した。

材料および方法

本試験はプラセボを対象とするランダム化二重盲検比較試験であった。本研究は日本国内の 22 の動物病院において、農林水産省による動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準にしたがって実施された。試験実施計画は動物用医薬品の規制当局である動物医薬品検査所と協議の上で作成された。組み入れ前に全ての飼い主が書面による同意書を提出した。

1. CKD 症例の 選択基準

満たすべき基準は以下の通りであった。sCr ≥ 1.6 mg/dl, 尿比重 (USG) < 1.035 , 尿蛋白/尿クレアチニン比 (UPC) < 1.5 および血清中 T4 濃度 $0.9 \sim 3.8$ $\mu\text{g/dl}$ 。IRIS の CKD ステージ分類で Stage II を sCr 1.6 mg/dl 以上と定義した IRIS ステージングガイドラインを参照して sCr が 1.6 mg/dl 以上とするカットオフを本研究における CKD 診断に採用した。上述の通り CKD の診断は USG < 1.035 の他に研究組み入れ前の 1 ヶ月以上にわたる sCr の持続的高値と USG 低値により再確認された。CKD が安定状態にあるのを確認するために sCr および USG を組み入れの 14 日前に測定した後に 7 日前にも再度測定した。エントリーした全てのネコは CKD が臨床的に安定しており、組み入れ資格を満たしていた。組み入れの流れを Fig-1 に示した。

2. 除外基準

妊娠しているか、以下の臨床徴候を有するネコは除外した。急性腎不全、慢性心不全（ニューヨーク心臓協会心機能分類がⅡ，ⅢまたはⅣ）、糖尿病、副腎皮質機能亢進症、尿路感染症、FeLV 感染、FIP 感染、悪性新生物、肝疾患または出血性疾患。頻回または定期的な皮下輸液療法を受けているネコも除外した。

3. BPS の投与量と試験方法

投与する BPS は 1 錠中に 55 μg の BPS を含む薬剤を使用し、これは TORAY（東レ株式会社，東京）より入手した。研究担当獣医師および飼主の盲検化を維持するために BPS 錠とプラセボ錠は鑑別不能な小さな白色錠剤とした。プラセボ錠は BPS が乳糖に置き換えられた点を除き組成は類似していた。試験に参加するネコは来院順に BPS 群とプラセボ群に 1:1 の割合で無作為に割り付けられた。BPS の投与は飼い主によって行われ給餌後 1 時間に、12 時間間隔で BPS 錠（55 $\mu\text{g}/\text{head}$ ）を経口投与した。投薬のコンプライアンス率を評価するために、投与した錠数を毎日飼い主が記録することとした。

投与試験に先駆けて各症例の臨床検査成績のベースラインを得る目的で、BPS 投与前に血液および尿検査を実施し測定値をベースラインとし、試験開始日を Day 0 とした。Day 0 は、ネコに BPS またはプラセボを初めて投与された日であった。試験期間は、180 日とし、その期間の Day 0，30，90，120，150 および 180 に臨床診療および臨床検査（身体検査・血液検査・尿検査）による評価を予定した。

4. 併用療法

試験開始の 2 週間以上前に強心薬，利尿薬，血液製剤，プロスタグランジン製剤，ヨード造影剤，副腎皮質ステロイド剤および NSAIDS 薬を中止した。降圧剤と経口吸着剤の使用は認められたが，用法・用量の変更は禁止した。試験開始前のこれらの薬剤の投与期間を記録した。腎臓病用療法食の使用も可としたが，試験中の食事の変更は禁止した。試験開始 1 ヶ月以内に与えられた食事の種類を記録した。併用治療が実施された場合も記録し，その影響については統計解析で考慮した。皮下輸液療法も必要性があれば行うこととした。しかし，ネコが来院前 7 日以内に皮下輸液療法を受けた場合は，臨床診療または臨床検査のデータを有効性解析データから除外した。

5. 実施評価項目

主要評価項目を sCr，血清リン/カルシウム (IP/Ca) 比または USG のベースライン値からの変化と予め定めた。副次評価項目は BUN，UPC，体重変化，臨床活動性スコア（身体活動性，食欲，脱水の程度），飼主による QOL 評価と予め定義し，（「かなり改善した」，「改善した」，「少し改善した」，「無変化」または「悪化した」）5 段階評価基準にしたがった評価を担当獣医師が実施した。

6. 血液学的検査

血液検体はネコごとに設定された時間帯に採取した。薬剤の安全性を評価するために CBC，TP，アルブミン (Alb)，グロブリン (Glob)，ALT，AST，ALP，T. Bill，

Gluco および電解質 (Na, K, Cl および Ca) の濃度を測定した。検体採取直後に CBC は施設内で測定し, その他の血液検体は冷蔵して IDEXX (アイデックスラボラトリーズ株式会社, 東京) へ送付した。

7. 尿検査

尿は Day0, 30, 60, 90, 120, 150 および 180 に採取した。尿検体は自然排尿から採取し, 採取直後に屈折計を用いて USG を測定した。UPC 比の測定には尿検体を採取直後に冷蔵して IDEXX (アイデックスラボラトリーズ株式会社, 東京) へ送付し, 光学顕微鏡検査と試験紙検査を用いて血尿と尿感染症のスクリーニング検査を行った。血尿と尿路感染症が検出された場合には検出日の尿検査データは, 有効性解析の対象から除外した。

8. 臨床診察

Day 0, 30, 60, 90, 120, 150 および 180 に飼主から病歴を聴取したあとに, Table-1 に示した採点法に基づいて臨床徴候スコア (身体活動性, 食欲, 脱水) を記録し体重を測定した。試験実施時点で診療所では信頼性のある手法をルーチンで使用していなかったことから血圧は測定しなかった。

9. QOL の評価および治療の印象

Day30, 60, 90, 120, 150 および 180 にベースラインとの比較における QOL の

変化（「かなり改善した」、「改善した」、「少し改善した」、「無変化」または「悪化した」）を飼主が記録した。Day30, 60, 90, 120, 150 および 180 に治療に関する主観的印象も担当獣医師により記録された。

10. 統計解析

試験治療を受けた全てのネコを安全性解析の対象（安全性解析対象）に含めた。治療期間が Day 90 未満のネコおよび研究実施計画から大幅な逸脱があったネコは、有効性解析の対象（有効性解析対象）から除外した。統計解析は Statview 5.0 または JMP 11 (SAS Institute Inc; Cary, NC, USA) を用いて実施した。主要評価項目の検定は、Bonferroni 法を用いて重回帰分析によって解析した。試験期間中のベースライン (Day0) から試験終了日 (Day180) までの sCr, IP/Ca 比, IP, Ca, USG, BUN, 体重および UPC 比の変化を反復測定分散分析 (ANOVA) で評価した。群間差は二元配置反復測定 ANOVA で解析した。Day180 時点の各群間差比較には Welch 検定を用いた。各サブグループ内におけるベースラインから試験終了日までの sCr の絶対変化を Wilcoxon の符号付順位検定を用いて解析した。群間差は二元配置反復測定 ANOVA で測定した。パラメトリック検定を適用する前に分布の正規性を Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した。2 群のそれぞれで試験開始前に腎臓病食が給餌されていた総期間を比較するために Mann-Whitney の U 検定を用いた。ベースライン時からの sCr の変化を目的変数として用いて重回帰分析を実施した。説明変数は BPS 投与, sCr 初期値, 性別, ACEI 薬投与および腎臓病食であった。さらに, sCr 初期値の代わりに IRIS によるステージを説明変数の一つとして用いて類似した重回帰分析を実施した。ベース

ライン時から試験終了時までの sCr の変化率を BPS 群とプラセボ群間で比較するために Welch 検定を用いた。臨床スコア（身体活動性，食欲，脱水）のベースラインから試験終了時までの変化を Friedman 検定で，BPS 群とプラセボ群間の臨床徴候の違いを Mann-Whitney の U 検定で比較した。BPS 群とプラセボ群間の QOL 評価および全体的な臨床的印象の違いを Mann-Whitney の U 検定で比較した。いずれの解析も $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

Table1. Clinical signs scoring system.

Variable	Score	Description
Physical activity	0	Active
	1	Normal
	2	Mildly lethargic
	3	Moderately lethargic
	4	Severely lethargic
Appetite	0	Increased
	1	Normal
	2	Decreased (3/4 normal)
	3	Decreased (1/2 normal), eat nothing at least once a week
	4	Eat nothing at least 2 days per week
Dehydration	0	Normal
	1	5% Dehydration (mild decreased skin turgor, dry mucosa)
	2	7%-8% Dehydration (markedly decreased skin turgor; CRT, 2-3 s; mild sunken eyes; cold limbs)
	3	10%-12% (Severely decreased skin turgor; CRT, over 3 s; markedly sunken eyes; shock; spasm; cold skin)
	4	12%-15% (Shock, moribundity)

CRT, capillary refill time.

成 績

1. 供試ネコ

150頭のネコをスクリーニングして、供試ネコ75頭を採用しBPS群またはプラセボ群に無作為割付けした。そしてBPS群の供試ネコ1頭が選択基準違反のため除外され供試ネコ74頭が被験薬またはプラセボによる治療を受けた (Fig-1)。供試ネコ11頭は試験投薬をDay 90行われなかったか (BPS群の供試ネコ2頭およびプラセボ群の供試ネコ4頭)、選択基準違反、併用薬禁止違反など試験実施計画からの逸脱が認められた (BPS群の供試ネコ6頭[その中で1頭はDay 90未満で投与を中止したので除外された]およびプラセボ群の供試ネコ2頭) ことで有効性解析の対象から除外された。最終的に有効性解析対象集団に含まれた63頭は、未去勢雄2頭、去勢済雄29頭、未避妊雌4頭、避妊済雌28頭で構成され、平均年齢は13.8歳齢 (範囲: 4~20歳齢) で平均体重は、4.3kg (範囲: 2.1~9.2kg) であった。有効性解析対象集団のベースライン特性は群間で均一に分布していた (Table-2-①, ②)。BPS群の供試ネコは31頭 (未去勢雄1頭、去勢済雄15頭、未避妊雌2頭、避妊済雌13頭) で構成され平均年齢は14.1歳齢 (範囲: 6.7~19.3歳齢) で平均体重は4.4kg (範囲: 2.1~9.2kg) であった。プラセボ群の供試ネコは32頭 (未去勢雄1頭、去勢済雄14頭、未避妊雌2頭、避妊済雌15頭) で構成され平均年齢は13.4歳齢 (範囲: 4.6~20歳齢)、平均体重は4.2kg (範囲: 2.24~6.75kg) であった。ベースライン時のsCrおよびBUNはBPS群がやや低かったが統計的に有意ではなかった。両群ともにIRIS分類のStage IIが多かった。(BPS群の供試ネコ31頭の中で供試ネコ24頭[77%])

およびプラセボ群の供試ネコ 32 頭の中で供試ネコ 19 頭[59 %])。残りの供試ネコは IRIS 分類の StageⅢに分類されていた。錠剤の平均投与率は BPS 群 91 % (範囲 73 %~100 %) でプラセボ群が 94 % (範囲 : 39 %~100 %) であった。

2. 併用治療

各群同数の供試ネコが併用治療を受けており BPS 群の供試ネコ 31 頭中の供試ネコ 10 頭 (32 %) とプラセボ群の供試ネコ 32 頭中の供試ネコ 10 頭 (31 %) が ACEI を投与されていた。また BPS 群の供試ネコ 4 頭 (13 %) とプラセボ群の供試ネコ 5 頭 (16 %) が、皮下輸液療法を受けており BPS 群の供試ネコ 2 頭 (7%) とプラセボ群の供試ネコ 1 頭 (3 %) が、経口吸着剤を投与されていた。すべての併用治療の投薬プロトコールは試験期間を通じて変更されなかった。試験開始前の ACEI の平均投薬期間は、BPS 群が 219 日 (範囲 : 63~760 日), プラセボ群 132 日 (範囲 : 57~132 日) であった。試験投与前の経口吸着剤の投与期間は BPS 群が Day 81 から Day 600 で、プラセボ群の投与期間は Day 93 であった。各群のネコが腎臓病食を与えられていた (BPS 群の供試ネコ 31 頭中の供試ネコ 17 頭[55 %], プラセボ群の供試ネコ 32 頭中の供試ネコ 15 頭[47 %])。試験開始前 1 ヶ月間から試験終了までどの供試ネコについても、食事の種類は変更されなかった。試験開始前に腎臓病食を与えられていた平均期間は BPS 群が (平均±SD : Day 542±827) でプラセボ群が (平均±SD : Day 368±709) であった。2 群間の差は、統計的に有意ではなかった (p=0.0679)。

3. 主要評価項目

sCr はプラセボ群 (平均±SD : 2.8 ± 0.7 が 3.2 ± 1.3 mg/dl に変化, Fig-2 A) では統計的に有意に上昇したが ($p=0.0030$), BPS 群 (平均±SD : 2.4 ± 0.7 が 2.5 ± 0.7 mg/dl に変化) は統計的には有意な上昇はなかった ($p=0.92$)。Day 180 時点での群間に有意差があった (0.8 mg/dl, 95 % CI : $0.2 \sim 1.3$, $p=0.0071$)。sCr の投与前と投与後の比較ではプラセボ群は有意に上昇した ($p=0.0091$) が, BPS 群においては有意ではなかった ($p=0.93$) (Table-3)。血清リンカルシウム比はプラセボ群 (平均±SD : 0.46 ± 0.10 が 0.52 ± 0.21 に変化, Fig-2 B) では統計的に有意に上昇したが ($p=0.0037$), BPS 群 (平均±SD : 0.50 ± 0.08 が 0.51 ± 0.11) は統計的に有意な上昇はなく ($p=0.30$), Day 180 時点の群間差は統計的に有意ではなかった (0.008 , 95 % CI : $-0.008 \sim 0.096$, $p=0.85$)。USG については, いずれの群にも統計的に有意な変化はなかった (BPS 群 : 平均±SD : 1.016 ± 0.006 が 1.017 ± 0.008 に変化, プラセボ群 : 平均±SD : 1.017 ± 0.007 が 1.015 ± 0.008 に変化, Fig-2 C)。

4. 副次評価項目

(1) 臨床検査

sCr と同様に BUN はプラセボ群 (平均±SD : 46.0 ± 11.9 が 57.4 ± 24.4 mg/dl に変化, Fig-3 A) では統計的に有意に上昇したが ($p < 0.001$), BPS 群 (平均±SD : 40.5 ± 13.2 が 43.1 ± 16.1 mg/dl に変化) では統計的に有意な上昇はなく ($p=0.94$), Day 180 時点での群間に有意差があった (14.3 mg/dl, 95 % CI :

3.4~25.2 mg/dl, $p=0.015$)。UPC 値については、いずれの群においても有意な変化は起こらなかった (BPS 群 : 平均 \pm SD : 0.1 ± 0.2 が 0.1 ± 0.4 に変化, プラセボ群 : 平均 \pm SD : 0.2 ± 0.3 に変化, Fig-3 B)。体重はプラセボ群 (平均 \pm SD : 4.19 ± 1.017 が 4.02 ± 1.13 kg に変化, Fig-3 C) は有意に減少したが ($p=0.001$), BPS 群 (平均 \pm SD : 4.38 ± 1.58 が 4.22 ± 1.27 kg に変化) は有意に減少しなかった ($p=0.37$)。Day 180 時点での群間には統計学的に有意差は認めなかった ($p=0.52$)。

(2) 臨床診察

身体活動性スコアはプラセボ群 ($p=0.035$, Fig-3 D) が, BPS 群 ($p=0.12$) より悪かった。Day 0 時点で嗜眠を呈した供試ネコの割合は BPS 群 (27 %) とプラセボ群 (23 %) で類似していた。Day 180 時点では嗜眠を呈した供試ネコの割合は BPS 群 (14 %) がプラセボ群 (31 %) より少なかった。食欲スコアは BPS 群で有意に改善した ($p=0.0099$, Fig-3 E)。プラセボ群には食欲スコアには有意な変化を認めなかったが ($p=0.67$), Day 180 時点では群間に統計学的な有意差が認められた ($p=0.0064$)。Day 0 時点では食欲不振を呈したネコの割合は類似していたのに対し (BPS 群 23 %, プラセボ群 29 %), Day 180 時点で食欲不振を呈していたネコの割合は BPS 群 (7 %) がプラセボ群 (31 %) よりも小さかった。脱水スコアは、いずれの群でも有意に変化しなかったが, Day 180 時点では BPS 群とプラセボ群間に統計学的な有意差を認めた ($p=0.025$, Fig-3 F)。

(3) QOL 評価および治療の印象

QOL の評価では「かなり改善した」、「改善した」および「少し改善した」と回答した総割合は, BPS 群がプラセボ群よりも統計学的に有意に大きかった (Day 0, 30, 90, 120, 150 および Day 180 時点でそれぞれ $p=0.0054$, $p=0.0015$, $p<0.001$,

p<0.001, p<0.001 および p<0.001; Fig-4 A および Fig-4 B)。治療の印象の評価では「かなり改善した」, 「改善した」 および 「少し改善した」と回答した総割合は BPS 群がプラセボ群よりも統計的に有意に大きかった (Day0, 30, 90, 120, 150 および Day 180 時点でそれぞれ p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001 および p<0.001; Fig-4C および Fig-4 D)。

(4) 事後評価解析

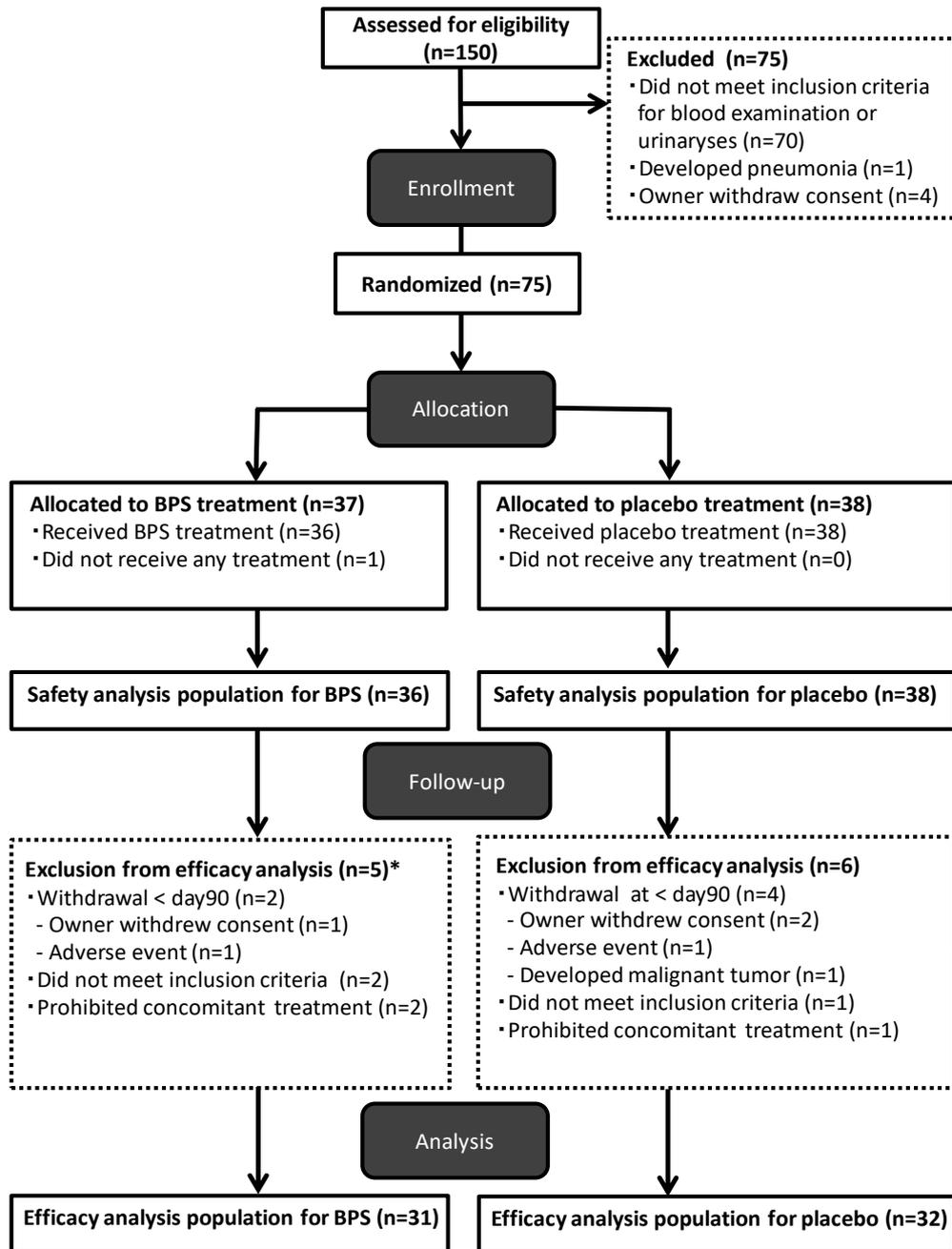
評価を明確にする目的として各項目を平均変化率で評価し, sCr の変化に影響する可能性があるサブグループ (処方食, ACEI, BPS, 性別, 年齢, sCr) を重回帰分析で評価した (Table-4)。sCr の Day 0 時からの平均変化率では, プラセボ群が 19 ± 34 % (平均 \pm SD) で BPS 群が 1 ± 15 % (平均 \pm SD) であった。Day 180 時点の群間差は有意であった (18%, 95 % CI: 4~32 %, p=0.014; Fig-5 A)。BUN, IP/Ca 比および IP のベースライン時からの平均変化率はプラセボ群ではそれぞれ 23 ± 32 , 14 ± 34 , および 16 ± 33 (平均 \pm SD) の上昇になったのに対し, BPS 群では低下した (5 ± 20 , 3 ± 23 , 2 ± 24 % [平均 \pm SD, Fig-5 B, C, D])。IP はプラセボ群 (平均 \pm SD: 4.4 ± 0.8 が 5.1 ± 1.9 mg/dl に変化) では統計学的に有意な上昇を認めたが (p=0.0012), BPS 群 (平均 \pm SD: 4.8 ± 0.8 が 4.9 ± 1.1 mg/dl に変化) では統計学的に有意な上昇を認めなかった (p=0.21)。Day180 時点の群間差も有意ではなかった (0.2 mg/dl, 95 % CI: $-0.7 \sim 1.0$ mg/dl, p=0.69)。Ca については, いずれの群も統計学的に有意な変化を示さなかった。Ca は, いずれの群においても変化しなかった (平均 \pm SD: BPS 群 0 ± 7 %, プラセボ群 2 ± 6 %, Fig-5 E)。Day 180 時点では, BUN についてのみ群間に有意差が認められた (18 %, 95 % CI: 4~32 %, p=0.015; Fig-5 B)。USG の平均変化率はプラセボ群が BPS 群より低かったが, 有意差は認められなかった (Fig-5 F)。

Day 0時からDay 180時点までのsCrの平均および絶対変化は、全てのサブグループ（すなわち、当初のIRIS Stage, 性別, 体重および年齢;Table-3）において、プラセボ群がBPS群よりも変動が大きかった。グループ解析から、IRIS分類のStage II p=0.013, 雌 p=0.036, 腎臓食なし p=0.04, ACEI投与 p=0.039の各サブグループ内においてBPS群とプラセボ群に統計学的有意差があることが示された(Table-3)。sCrのDay 0時点からの上昇を目的変数, sCr初期値, 性別, ACEI, 腎臓病食の給餌およびBPS投与を説明変数とした重回帰分析によれば, sCr上昇の抑制に有意に影響を及ぼした唯一の因子は, BPS投与であった(p=0.0263, Table-4)。同様に説明因子としてsCrのベースライン値の代わりに当初のIRIS Stageを用いた別の解析でもBPS投与が, sCrの上昇を有意に抑制した唯一の因子であることが判明している(Table-3)。試験期間中にIRISのStageが高ステージへ進行した(Stage IIからStage IIIまたはStage IIIからStage IVへ進行した)供試ネコとして, 初期のIRIS分類でStage IIであった供試ネコでは, BPS群の24頭中3頭(13%)に対し, とプラセボ群の供試ネコ19頭中の供試ネコ6頭(32%)であった。また, 初期のIRIS分類でStage IIIであった供試ネコでは, BPS群の供試ネコ7頭中0頭(0%)に対し, プラセボ群の供試ネコ13頭中の供試ネコ3頭(23%)であった。

5. 有害事項

安全性解析対象集団において報告された全ての有害事項の発生頻度は, BPS群では16例(32件), プラセボ群では22例(61件)であった。BPS群の有害事項で治療に関連していると判定されたものは無かった。しかし, プラセボ群の1件

の有害事項は、治療に関連していると判定された。このネコは試験開始時期より 4 日間にわたり、プラセボ投与後の 3 時間に嘔吐した。いずれの群においても CBC ならびに、その他の血液生化学検査に臨床的に関連ある変化はなかった。



*one cat was excluded for two reasons: withdrawal at <day 90 and prohibited concomitant treatment.

Fig-1 Participant flow. BPS,beraprost sodium.

Table 2-① Baseline characteristics of cats in the efficacy analysis population

Variable	BPS (n = 31)			Placebo (n = 32)		
	Mean	(min-max)	(%)	Mean	(min-max)	(%)
General						
Age (years)	14.1	(6.7-19.3)		13.4	(4.6-20)	
BW (kg)	4.4	(2.1-9.2)		4.2	(2.2-6.8)	
Sex						
Female - intact			2 (6.5)			2 (6.3)
Female - neutered			13 (41.9)			15 (46.9)
Male - intact			1 (3.2)			1 (3.1)
Male - neutered			15 (48.4)			14 (43.8)
Clinical symptoms						
Lethargy			8 (25.8)			7 (21.9)
Decreased appetite			7 (22.6)			9 (28.1)
Dehydration			12 (38.7)			18 (58.1)
IRIS staging						
Stage II			24 (77.4)			19 (59.4)
Stage III			7 (22.6)			13 (40.6)
Serum Biochemistry						
sCr (mg/dl)	2.4	(1.6-4.1)	61.3% >	2.8	(1.8-4.3)	87.5% >
BUN (mg/dl)	40.5	(24-73)	61.3% >	46.0	(22-70)	81.3% >
Alb (g/dl)	3.0	(2.2-3.6)	6.5% <	3.0	(2.3-3.9)	12.5% <
Glob (g/dl)	4.5	(3.1-5.8)	22.6% >	4.3	(3.1-7.1)	12.5% >
ALT (U/L)	77.2	(37-234)	9.7% >	51.0	(20.0-	12.5% <
AST (U/L)	34.5	(16-73)	29.0% >	28.5	(14.0-	18.8% >
						6.3% <
ALP (U/L)	27.8	(13-49)	0%	27.9	(13.0-	0%
Na (mEq/L)	152.5	(146-158)	0%	152.3	(148-157)	0%
K (mEq/L)	4.4	(3.2-5.3)	0%	4.4	(3.5-6.3)	6.3% >
Ca (mg/dl)	9.7	(8.8-12.2)	3.2% >	9.7	(8.3-11.8)	6.3% >
P (mg/dl)	4.8	(3.8-7.5)	3.2% >	4.4	(2.8-6.2)	0%

Table 2-②. Baseline characteristics of cats in the efficacy analysis population

Variable	BPS (n = 31)			Placebo (n = 32)		
	Mean	(min-max)	(%)	Mean	(min-max)	(%)
CBC						
RBC ($\times 10^6/\mu l$)	7.3	(3.3-10.7)	3.2% > 19.4% <	7.5	(5.3-10.9)	9.7% > 19.4% <
Hb (g/dl)	11.7	(6-15.7)	3.2% > 12.9% <	11.9	(8-17.1)	9.7% > 16.1% <
Ht (%)	35.6	(19.4-52.5)	12.9% > 25.8% <	35.5	(22.2-51)	6.5% > 19.4% <
WBC ($\times 10^3/\mu l$)	9.8	(3.5-15.1)	6.5% <	9.2	(3.7-15.3)	3.2% <
PLT ($\times 10^4/\mu l$)	28.0	(0.4-46.3)	6.9% <	31.6	(11.2-)	14.3% < 3.6% >
Urine biochemistry						
USG	1.016	(1.007-1.033)	59.3% <	1.017	(1.002-)	34.8% <
UPC ratio	0.07	(0-0.58)	0%	0.16	(0-1.23)	4.2% >
Borderline proteinuric (0.2-0.4)			2 (6.5)			5 (15.6)
Proteinuric (>0.4)			2 (6.5)			2 (6.3)

These values indicate the percentage of cases out of the reference range. For example “3,2%>, 19.4%<” of the RBC in BPS group indicates that 3.2% of the cases exceeded the upper limit of the reference range of RBC and that 19.4% of the cases were below the lower limit of the reference range of RBC.

BPS —●— Placebo —◆—

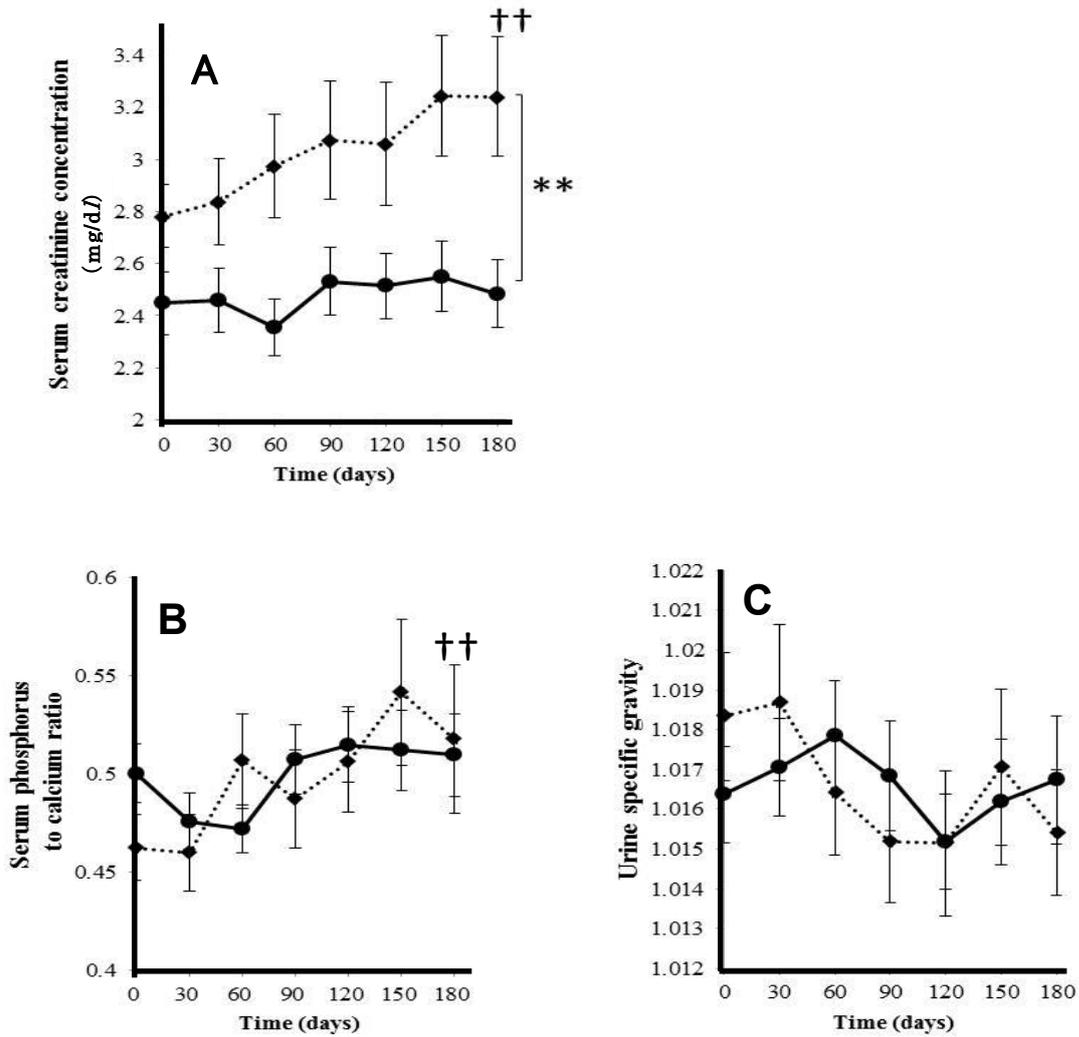


Fig-2 Changes in the primary outcomes from baseline values in the efficacy analysis population. Data are shown as mean \pm SE. ** $p < 0.01$ in comparison between the BPS group and the placebo group at the day 180. † † $p < 0.01$ in comparison of posttreatment with baseline within each group. P values have been adjusted for multiplicity by the Bonferroni.

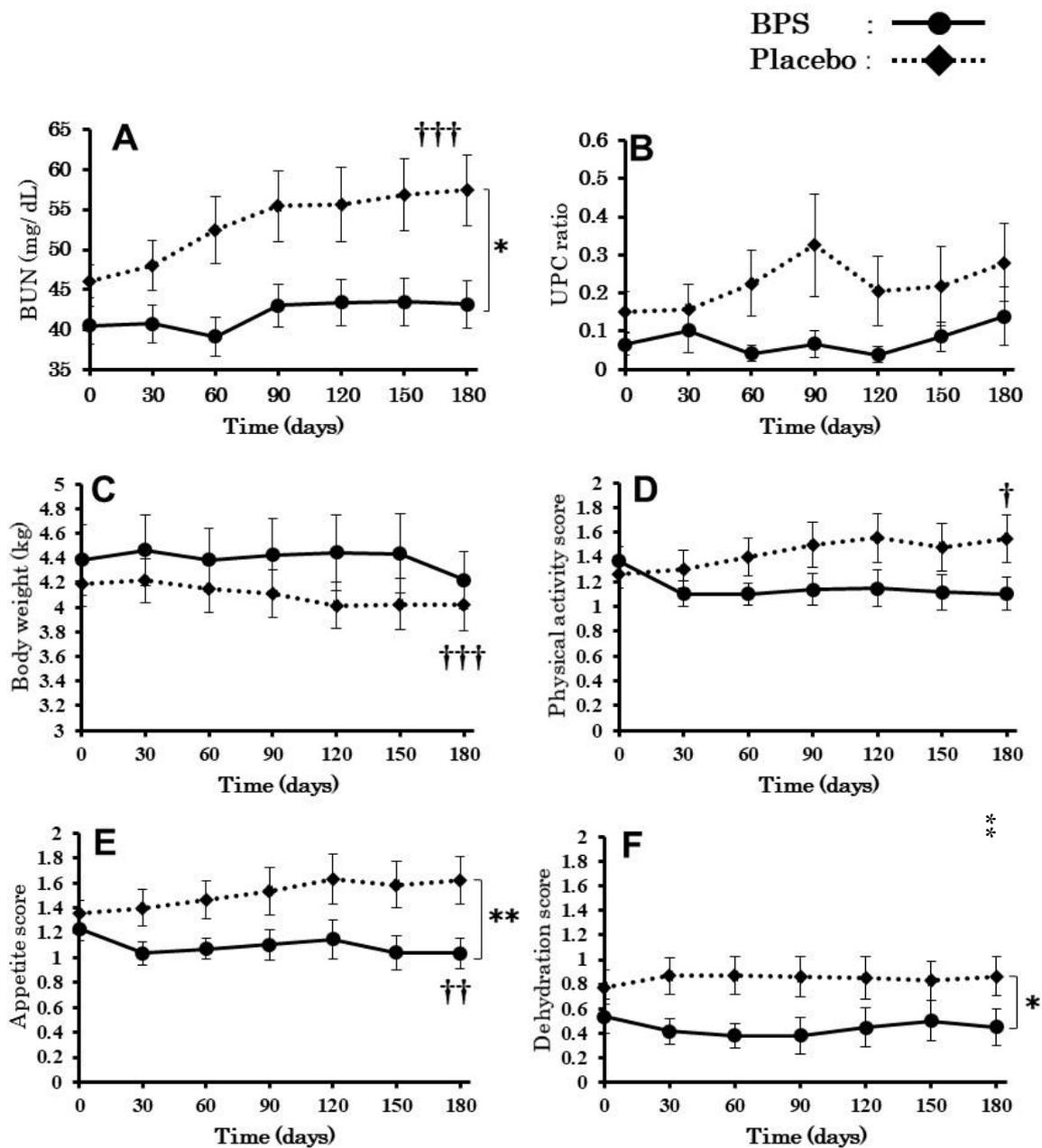
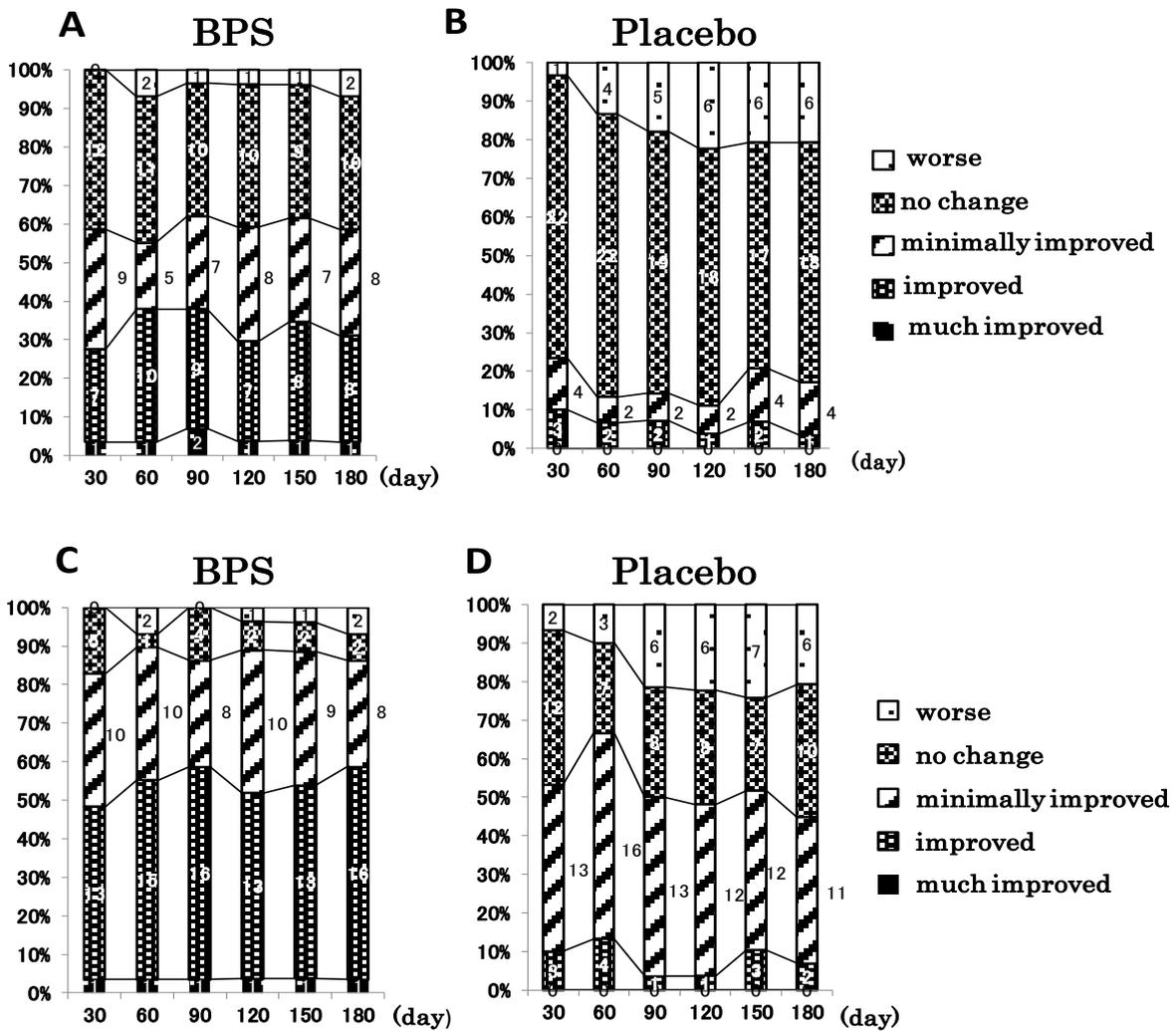


Fig-3. Changes in the secondary outcomes from baseline values in the efficacy analysis population. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in comparison between the BPS group and the placebo group at the day 180. † $p < 0.05$, † † $p < 0.01$, and † † † $p < 0.001$ in comparison of posttreatment with baseline within each group.



P values were adjusted for multiplicity by Bonferroni method.

Fig-4 Changes in the quality-of-life assessment (A, B) and impression of the treatment (C, D).

Table -3. Changes in the serum creatinine level from baseline to day 180, based on the treatment and subgroups.

	BPS						Pre.T VS Post.T	Placebo						B V S	
	M	SD	Median	Range	IQR	N		M	SD	Median	Range	IQR	N	Pre.T VS Post.T	P
All Cats	+0.02	0.37	+0.05	-0.7to +0.9	0.5	28	0.93	+0.52	0.99	+0.4	-1.7 to +2.5	1.25	28	0.0091*	0.015*
Subgroups of cats															
IRIS stage2	+0.09	0.34	+0.10	-0.4to +0.9	0.4	21	0.40	+0.49	0.69	+0.4	-0.3 to +2.4	0.90	17	0.01*	0.013*
IRIS stage3	-0.19	0.43	-0.30	-0.7to +0.5	0.8	7	0.30	+0.57	1.37	+0.9	-1.7 to +2.5	2.3	11	0.24	0.34
Male	+0.01	0.44	0.00	-0.7to +0.9	0.5	15	0.97	+0.59	1.18	+0.2	-1.7 to +2.5	1.6	12	0.13	0.18
Female	+0.03	0.30	+0.10	-0.4to +0.5	0.5	13	0.79	+0.47	0.86	+0.4	-1.0 to +2.4	1.2	16	0.049*	0.036*
BW, <4 kg	-0.10	0.29	-	-0.6to +0.3	0.5	12	0.26	+0.59	0.87	+0.5	-1.0 to +2.4	1.05	16	0.016*	0.078
BW, ≥4 kg	+0.09	0.42	+0.10	-0.7to +0.9	0.6	15	0.41	+0.43	1.17	+0.1	-1.7 to +2.5	1.58	12	0.23	0.11
Age <14 y	+0.05	0.41	+0.05	-0.4to +0.9	0.5	10	0.96	+0.50	1.07	+0.2	-1.7 to +2.5	1.55	13	0.13	0.12
Age ≥14 y	+0.00	0.36	+0.05	-0.7to +0.7	0.5	18	0.97	+0.51	0.98	+0.4	-1.0 to +2.4	1.36	14	0.089	0.073
Concomitant t															
With renal s.d	+0.05	0.44	-0.10	-0.6to +0.9	0.7	15	0.68	+0.58	1.01	+0.5	-1.0 to +2.5	1.35	13	0.06	0.10
Without renal s.d	-0.02	0.30	+0.10	-0.7to +0.3	0.4	13	0.86	+0.47	1.00	+0.4	-1.7 to +2.4	1.3	15	0.09	0.04*
With ACEI	+0.05	0.34	0.00	-0.3to +0.7	0.5	10	0.65	+0.94	1.01	+1.0	-0.3 to +2.5	1.95	9	0.023*	0.039*
Without ACEI	0.00	0.40	+0.10	-0.7 to +0.9	0.5	18	1.0	+0.32	0.94	+0.2	-1.7 to +2.4	1.1	19	0.15	0.14

B VS P, BPS VS Placebo; M, Mean; IQR, interquartile range; Pre T. VS Post T., Pretreatment VS Posttreatment; SD, standard deviation ; Concomitant t, Concomitant treatment; With renal s.d, With renal specific-diet; Without renal s.d, Without renal specific-diet

Table 4. Results of multiple regression analysis of the change in the sCr at day 180 from the baseline as the objective variables.

	Unstandardized coefficient	SE	Standardised coefficient	t	p
Intercept	9.712	33.171	9.712	0.293	0.7709
Renal specific diet	1.576	7.934	0.029	0.199	0.8434
ACEI	-8.409	8.383	-0.146	-1.003	0.3208
Beraprost	17.624	7.688	0.326	2.292	0.0263
Sex	0.039	7.455	0.001	0.005	0.9958
Age	-0.552	1.098	-0.070	-0.503	0.6174
sCr	-2.746	5.723	-0.069	-0.480	0.6335

Renal-specific diet, ACEI, BPS, sex, age, and baseline sCr level were set as the explanatory variables.

Difference in % change of sCr from the baseline to day 180 is 17.624% between BPS and placebo group.

Other parameters showed no significant influence.

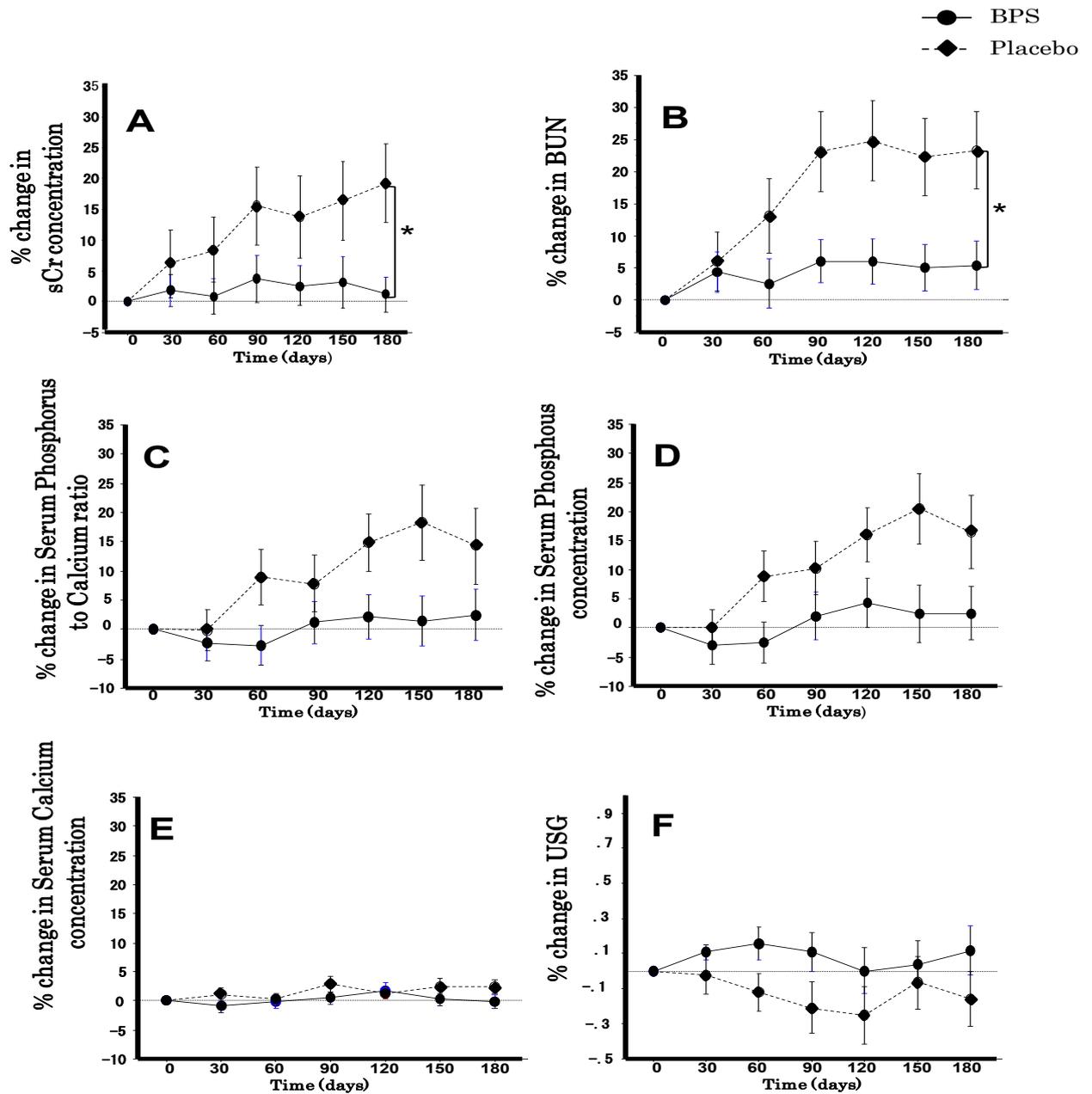


Fig-5 Changes the sCr, serum phosphorus-to-calcium ratio, USG, BUN, serum phosphorus and calcium from baseline value in the efficacy analysis population in case baseline values were set to zero. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ in comparison between the BPS group and the Placebo group at the day 180.

考 察

本試験は CKD ネコの治療における BPS の有効性と安全性を評価することを目的としていた。予め定義した主要評価項目の中で sCr は BPS 群では有意に上昇しなかったが、プラセボ群では有意に上昇した。群間差は統計学的に有意であった。このことは BPS 群の治療が CKD ネコの腎濾過機能悪化を抑制したことを示唆した。

先行研究から CKD ネコ[7, 98]およびヒト[56, 72]では腎線維症の重症度は、sCr 濃度などの腎濾過機能マーカーと最もよく相関することが明らかにされている。腎線維症は尿蛋白質や炎症、高リン血症、低酸素症などの複数の因子によってもたらされる。腎臓の低酸素状態は線維症を悪化させ腎臓の低酸素状態と線維化を亢進させるという悪循環をもたらす。近年、尿細管間質の低酸素状態が、末期腎不全を引き起こすあらゆる原疾患の最終的な共通経路として研究されている[15]。そして実際に低酸素状態が、その発症機序において重要であることを示す結果が増えてきている[16, 53, 100, 101]。さらに最近の研究からネコにおいても腎臓の低酸素状態が、CKD の予後に関連している可能性が示唆された[32]。ほとんどの CKD ネコは慢性の尿細管間質の炎症および線維化を特徴とする病理組織学的所見を有している[7, 13, 98]。尿細管間質の線維化は原因疾患にかかわらず腎臓機能と相関[7, 98]しており尿細管間質の線維化を抑制することが腎臓の濾過機能を維持することになる。第 II 章では BPS が尿細管間質性腎炎による尿細管間質の線維化を著明に抑制することを証明した。本研究は CKD ネコに対する BPS 治療が、BPS の薬理作用である内皮細胞保護作用や抗炎症作用、血管拡張作用、抗血小板作用[1, 58]、腎血流増加作用[83, 85]に加え線

維化抑制作用[82]が低酸素状態を改善し、この悪循環を断ち切り腎機能の更なる低下を防いだことを示唆するものである。これらの研究結果は BPS が末期 CKD への共通した悪化経路に対して作用している可能性があり、特に尿細管間質の低酸素状態に作用している可能性が高いことを強く示唆している。

本試験の投与量を 55 $\mu\text{g}/\text{head}$ に設定した。用量設定の根拠は以下の通りである。第Ⅲ章で健常ネコを対象として BPS の安全な経口的、連日投与可能量は 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ であると結論した。第Ⅳ章では自然発症 CKD ネコを対象として BPS を 150 $\mu\text{g}/\text{head}$ (平均値 $33.90 \pm 3.87 \mu\text{g}/\text{kg}$, 最高投与量 40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で投与し安全性を確認した。しかし、BPS を投与した対象は健常ネコ 6 頭と合併症を有しない CKD ネコ 4 頭だけであり、以上の結果から本研究の CKD ネコを対象とした投与量の設定は困難である。第Ⅲ章で健常ネコに対して BPS 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与すると一過性ではあるが心拍数は約 9 % 上昇した。心拍数の増加は循環器疾患を有するネコには注意が必要である。ネコの肥大性心筋症では低下した心拍出量を維持するため生体は心拍数を増加して代償しているが、さらなる心拍数の増加は、心筋の労働負荷、圧負荷の増大により心不全に陥りやすくなる。またネコの肥大性心筋症は不整脈を合併することが多く、心拍数増加は不整脈を悪化させる危険性がある。BPS を CKD ネコに臨床応用する際に、何らかの合併症を有する CKD ネコに対して BPS 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の投与は安全性から回避すべきである。健常ネコへの BPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与は無影響であり BPS 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ は心拍数を増加させる。CKD ネコおよび合併症を有する CKD ネコの安全性と有効性を考慮すると BPS の投与量は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満と思われる。またネコの体重から投与量を設定すると経験値ではあるが、ネコの体重は約 2~5 kg 程度が最も多いと思われる。そこで体重 2 kg のネコの BPS の投与量が 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下で体重 5

kgのネコのBPSの投与量が10 µg/kg以上になるように安全性と有効性を考慮して投与量の範囲を設定し、投与量を55 µg/headに設定した。

本試験実施時点において、ネコの血圧測定に利用できる有効性が検証された信頼性のある手法がなかったことから血圧は測定しなかった。健常ネコを対象とした第Ⅲ章の研究において最高100 µg/kgまでの用量のBPSが血圧に影響を与えなかったことを確認している[84]。そのため本研究における55 µg/headの用量が血圧低下に急性の作用をもたらすことはないであろうと推定した。またヒトを対象とした研究も、BPSが血圧を低下させることなくsCrの上昇を抑制させることを示唆している[17]。このように血圧低下がBPSの作用機序に関与している可能性は低い。

本試験の主要評価項目の一つであったsCrのベースライン時からの変化に関するサブグループ解析は、BPS群ではプラセボ群よりも、IRISの分類StageⅡ，雌，腎臓病用療法食の給餌なしおよび、ACEIと投与ありの各サブグループ内におけるsCr上昇の抑制が有意であった事を示唆している。一方、この変数に影響を及ぼした因子に関する重回帰分析ではBPS投与のみが抽出され、他の変数でsCr上昇の抑制に有意な影響を及ぼしたものは認められなかった。このためサブグループにおけるBPSの有効性を裏付けるには更なる研究が必要である。sCrのベースライン値は、BPS群がプラセボ群よりもわずかであるが非有意に低かったが、ベースラインの調整後であっても重回帰解析はsCrについてBPSの有効性を示した。

本研究に血清リン/カルシウム(IP/Ca)比を設定したが、これは主要評価項目の一つとして設定されたIPの指標とみなされた。しかし、この指標の臨床的意義は、まだ十分に確立されていない。したがってIPとCaについて事後解析を

実施した。血清 IP 濃度の高値は高窒素血症進行の予測因子であると報告されている [8]。事後解析からプラセボ群における IP の上昇が示されたが、BPS 群ではそのような上昇は観察されなかった。この結果は IP/Ca 比の結果と類似しており BPS 投与が IP の上昇を阻害しうることを示唆している。

先行研究は、sCr 濃度高値が CKD ネコの予後に関する最良の予測因子の一つであることを明らかにしている [32, 81]。これらの事から BPS 投与により sCr 濃度の上昇を抑制すれば CKD ネコの予後を改善させられるかもしれない。BPS 治療は、腎疾患モデルラットにおいて生存率を有意に改善することがこれまでに報告されている [9]。そのため BPS が、CKD ネコの長期生存に対する BPS の潜在的効果を評価する今後の研究が必要とされている。

BPS 群では臨床症状も改善した。食欲スコアは、BPS 群で有意に改善したが、プラセボ群では改善しなかった。身体活動性スコアは、プラセボ群が BPS 群と比べて有意に悪かった。CKD ネコの大部分が食欲低下を示していたが [13]、Day 180 において食欲低下を示したネコは BPS 群では 7 % だけであったのに対してプラセボ群では 31 % であった。食欲増加は BPS 群における体重の有意な減少の抑制に役立った。BPS 治療は食欲レベルを正常レベルまで有意に増加させた。CKD ネコの食欲不振は尿毒症毒素による化学受容体の刺激によって起こっている可能性がある [80]。最近の報告では糸球体腎炎ラットモデルおよびヒトの患者において、BPS 治療が尿毒症毒素を減少させたと述べている。食欲の増進は、CKD ネコにおける尿毒症毒素の減少に起因しているのかもしれない。第 IV 章において尿毒症症状（食欲および活動性低下）を Day 30 以内に改善し、Day 180 維持されることが初めて示され、第 V 章の臨床症状の改善と一致した。また第 IV 章で認められた BPS 投与による消化器運動の改善は、尿毒症リスクの一つであ

る腸管での蓄積した尿毒症物質の排除を促進し尿毒症症状を改善している可能性があり、食欲の増進にも関与していると考えられることから BPS 群の QOL の向上と関連があるかもしれない。説明としては腸間膜動脈に対する BPS の血管拡張作用が関係しているのかもしれない。BPS は、腸間膜動脈や腎動脈に対して他の動脈に対するよりも比較的強い弛緩作用を有している[1]。腸管膜動脈における血流増加は、消化管運動の改善や代謝活動を活発化させ、それによって食欲を亢進させている可能性がある。食欲に対する効果と同様に Day 180 時点で嗜眠を呈した供試ネコは、BPS 群（14 %）がプラセボ群（31 %）よりも少なかった。臨床スコアにおけるこれらの改善は飼主による QOL 評価や獣医師による治療の印象における良好な評価と相関しているかもしれない。特に慢性疾患においては飼主の関与の促進が重要である[69]。臨床徴候の改善と薬理効果の早期認識は治療およびコンプライアンスの継続に対する意欲を維持する上で有益になる可能性がある。

本研究では、BPS は ACEI[32]や ARB[77]の治療標的である UPC 比にかかわらず sCr, BUN, IP/Ca 比の上昇を抑制した。BPS は ACEI や ARB と類似した血管拡張作用を有している。研究結果はヒトの CKD 患者に対する 60 $\mu\text{g}/\text{day}$ の BPS 投与が、糸球体過剰濾過に影響を及ぼすことなく腎臓血流を増大させる[17]のに対して、ACEI は糸球体輸出細動脈を選択的に拡張し、糸球体濾過圧を低下させ過剰濾過を改善させる[32]ことを示唆している。本研究における UPC 比の非有意な変化は、糸球体高血圧に対する BPS の穏やかな作用を反映しているのかもしれない[22]。これらの結果は本症例では単に UPC 比が低かったことによって起こったと考えられる。

他者での先行研究[33]はベナゼプリルが CKD ネコの尿蛋白質を有意に低減さ

せたことを示唆しているが、この効果は UPC 比が高値のネコで効果が最大となった。これらのことから ACEI の使用は、UPC 比が 0.4 以上の CKD ネコで推奨される [26, 40]。いくつかの報告は CKD ネコの半数から 3 分の 2 は尿蛋白質を呈していないか軽度の尿蛋白質のみを呈していることを明らかにしている [20, 33, 81]。したがって BPS は、尿蛋白質の有無にかかわらず CKD ネコにとって新たな治療選択肢の一つとなりうる。

治療期間中に薬物治療に関連した有害事象は、安全性解析集団におけるプラセボ群の 1 例のみに発現した。他に報告されている有害事象は、大部分が CKD の症状に関するものであり、これらはプラセボ群で比較的頻度が高かった。臨床診察および臨床検査では、BPS 群に関連性のある変化は無かった。さらに平均的コンプライアンス率は、いずれの群でも 90 % を上回っていた。これらの結果は CKD ネコの治療において BPS は、安全かつ忍容性が良好であることを示唆している。

結論として BPS は、CKD ネコの sCr によって測定される腎濾過機能の低下を有効的に抑制し、臨床症状を改善した。さらに有害事項は、最小限でありコンプライアンス率は高かった。本研究結果は、BPS が CKD ネコの治療にとって有効かつ安全な薬剤であることを示している。

小 括

本試験の目的は、自然発症した CKD ネコにおける BPS の有効性と安全性に対する評価とした。

供試ネコの選択基準として、臨床的に安定した自然発症 CKD ネコで sCr \geq 1.6mg/dl, 尿比重 (USG) $<$ 1.035, UPC 比 $<$ 1.5 および血清中 T4 濃度 0.9~3.8 μ g/dl とした。除外基準として妊娠, 急性腎障害, 慢性心不全, 糖尿病, 副腎皮質機能亢進症, 尿路感染症, 白血病ウイルス感染, 伝染性腹膜炎, 悪性新生物, 肝疾患, 出血傾向のあるネコ, 頻回および定期的な皮下輸液療法を受けているものとした。

上記の基準を満たし採用された供試ネコ 63 頭にプラセボを対象とするランダム化二重盲検比較試験を採用し BPS 群 (31 頭) とプラセボ群 (32 頭) に 1:1 の割合で無作為に割り付けた。飼い主が給餌後に 12 時間間隔で BPS 錠 (BPS 55 μ g/head) またはプラセボ錠を 180 日間経口投与した。本研究は日本における 22 の動物病院において農林水産省の動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準にしたがって実施された。

主要評価項目を sCr, IP/Ca 比または USG のベースライン値からの変化と予め定めた。副次評価項目は BUN, 体重変化, UPC, 臨床活動性スコア (身体活動性, 食欲, 脱水), 飼主による QOL 評価, 予め定義した 5 段階評価基準にしたがった担当獣医師による治療の印象と定義した。

主要評価項目の成績は以下である。

1. sCr はプラセボ群 (平均 \pm SD : 2.8 \pm 0.7 が 3.2 \pm 1.3 mg/dl に変化) では有意 ($p=0.0030$) に上昇したが, BPS 群 (平均 \pm SD : 2.4 \pm 0.7 が 2.5 \pm 0.7

mg/dIに変化)では有意に上昇しなかった ($p=0.92$)。BPS 投与 Day 180 時点の群間差は有意であった (0.8 mg , $95 \% \text{ CI} : 0.2 \sim 1.3 \text{ mg/dI}$, $p=0.0071$)。

2. IP/Ca 比は, プラセボ群 (平均 \pm SD: 0.46 ± 0.10 が 0.52 ± 0.21 に変化)では有意 ($p=0.0037$) に上昇したが, BPS 群 (平均 \pm SD: 0.50 ± 0.08 が 0.51 ± 0.11 に変化) で有意な上昇はなかった ($p=0.30$)。BPS 投与 Day 180 時点の群間差は有意ではなかった (0.08 , $95 \% \text{ CI} : -0.08 \sim 0.096$, $p=0.85$)。

3. USG はいずれの群においても有意な変化はなかった。

副次評価項目

1. BUN はプラセボ群 (平均 \pm SD: 46.0 ± 11.9 が $57.4 \pm 24.4 \text{ mg/dI}$ に変化)では有意 ($p < 0.001$) に上昇したが, BPS 群 (平均 \pm SD: 40.5 ± 13.2 が 43.1 ± 16.1 に変化) は有意な上昇はなかった ($p=0.94$)。BPS 投与 Day 180 時点の群間差は有意であった (14.3 mg , $95 \% \text{ CI} : 3.4 \sim 25.2 \text{ mg/dI}$, $p=0.015$)。

2. UPC 比については, いずれの群においても有意な変化は起こらなかった。

3. 体重は, プラセボ群において有意に減少したが BPS 群は有意に減少しなかった。

4. 身体活動性スコアでは, プラセボ群は BPS 群と比較して悪かった。

5. 食欲スコアでは BPS 群は, 有意に改善したがプラセボ群には変化が見られなかった。

6. 脱水スコアは Day 180 時点の群間差において BPS 群とプラセボ群に有意な差が見られ ($p=0.025$) BPS 群が改善した。

7. QOL の評価では BPS 群がプラセボ群と比べて有意に改善した。

有害事項

治療に関係があると判定された有害事象は, プラセボ群の 1 例であった。

CBC および血液化学検査において臨床的に関連性のある変化はなかった。

結論として BPS は、CKD ネコに対して腎臓機能の低下を抑制し、臨床症状を改善させる効果が認められた。また BPS のネコの CKD に対する有効性と高い安全性が確認され、ネコの CKD の進展を遅らせることが判明し、BPS がネコの CKD に対して臨床応用が可能であることが確認された。

第 VI 章

総括

ネコの慢性腎臓病（CKD）の主な病因は尿細管間質性腎炎で、ヒトのCKDの病因は糸球体腎炎で病態が異なるものである。そのためヒトと病態が異なるCKDネコに、ヒトで使用されている治療薬に十分な効果が期待できないのは当然と思われる。したがってCKDネコの病態に適した新たな治療薬が望まれている。BPSは、プロスタサイクリンの誘導体であり化学的に安定であり高い経口生物学的利用能と長い生物学的半減期を有する。ヒトの医療分野において末梢血管障害や、肺高血圧症の治療に長年に亘り臨床応用されている。腎臓病領でもBPSの腎臓病に対する有効性を示す報告がなされている。これらの報告は、CKDネコに対してBPSが有効な治療薬となる可能性を示唆するものである。

第II章ではBPSをCKDネコに対して臨床応用するにあたり、新しく考案したPUUO解除ラットモデルを用いてCKDネコの主な病因である尿細管間質性腎炎を作成した。そしてBPSのCKDネコの病態である尿細管障害や尿細管間質線維化の抑制効果を検討した。

1. PUUO解除ラットモデルは、血液および尿を用いた閉塞腎の腎臓機能評価には適さないが腎障害の病理組織学的評価に適していることが判明した。

2. BPSが尿細管障害や尿細管間質の線維化を阻止することが判明した。

プロスタサイクリン（および誘導体）は、種特異性が高いために各種動物に対して各々、安全な投与量を設定する必要がある。

第III章ではBPSを健常ネコに対して10, 30, 70, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単日経口投与および休薬期間7日間を設けながら1日2回7日間の連日経口投与を実施し、血液、血行動態、臨床症状における有害事項の出現を観察し、健常ネコにおけるBPSの安全な経口投与量を検討した。

1. BPSの7日間連日投与で各投与量において血球数および血液中Na, K, Cl濃度への影響は認められなかった。

2. 血行動態への影響では、心拍数の有意な増加が 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPS の単日経口投与で出現した。心拍数の増加は用量依存性であり、投与量によらず最大反応は投与後 0.5 時間目で、その後速やかに投与前の値に復した。
3. BPS の各投与量において血圧は収縮期圧，拡張期圧および脈圧ともに有意な変化は認められなかった。
4. BPS の 7 日間連日経口投与で BPS は用量依存性に sCr 値および BUN 値を低下させた。sCr および BUN は低下した数値が休薬期間中に再増加するため、臨床において効果持続には BPS の連日投与が必要と思われた。
5. BPS の 7 日間連日経口投与で AST, ALT 値が低値で維持され AST, ALT 値は共に休薬期間中に再上昇する傾向は認められなかった。
6. BPS の 10 および 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ の単日経口投与および 7 日間の連日経口投与では、全ての供試ネコで何ら特筆すべき臨床症状の変化は認められなかったが、70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で下痢や嘔吐，鎮静などの有害事項が出現した。

以上の結果から健常ネコにおける BPS の安全な経口的，連日的 BPS 経口投与可能量は、30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid.}$ (60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) であると結論した。

第IV章では自然発症 CKD ネコに対して BPS を平均値 $33.90 \pm 3.87 \mu\text{g}/\text{kg}$ (範囲：28.8~40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を 180 日間投与し、CKD ネコに対する長期経口投与の安全性と腎臓機能への有効性および尿毒症症状に対する有効性を評価した。

1. 供試 CKD ネコ 5 頭に対して BPS を 150 $\mu\text{g}/\text{head}$ (平均 \pm SD: $33.90 \pm 3.87 \mu\text{g}/\text{kg}$, 範囲：28.8~40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 1 日 2 回で 180 日連日経口投与した結果、供試 CKD ネコの腎臓機能は維持され BPS の腎臓機能に対する有効性を確認した。
2. 尿毒症症状 (食欲および活動性低下) に BPS を連日経口投与開始から 1 ヶ

月以内に改善し、180日間維持されることが初めて示された。尿毒症症状の改善は、体重増加という全身状態を示す所見と血液化学検査でTC値の増加という客観的な指標の改善を伴っており、有意に改善を示した。他の動物種においてもBPS投与によって体重の増加を伴う尿毒症症状の改善をもたらすことは知られていない。

3. 尿毒症の改善に関しては、sCr, BUN, AST, ALT, ALP, T.Bil 値の有意な変動は認められないことから、腎臓機能および肝臓機能とは全く別のメカニズムが関与しているか、あるいはsCr, BUNに反映されないGFRの改善が関与している可能性が考えられる。
4. BPSの投与量平均値 $33.90 \pm 3.87 \mu\text{g}/\text{kg}$ (最高投与量 $40.5 \mu\text{g}/\text{kg}$) では、下痢などの消化器運動の亢進はなく消化管運動を促進維持し、生理的な排便が可能であった。
5. BPS投与による消化管運動の改善は、尿毒症リスクの一つである腸管での蓄積した尿毒症物質の排除を促進し尿毒症症状を改善している可能性があり、食欲の増進にも関与していると考えられることからCKDネコのQOLの向上に関与していたと思われる。
6. BPSの180日間の連日経口投与において血球数および血液化学検査項目への影響は認められなかった。自然発症CKDネコに対して投与したBPS投与量は、健常ネコで1日2回の安全な連続投与が可能であった $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ を上回ったが、安全性について特に問題を認めなかった。

第II章から第IV章までの結果を基に、第V章ではBPSを臨床応用することを目的として、自然発症CKDネコに対してプラセボを対象とするランダム化二重盲検比較試験を実施しBPSの腎臓機能への有効性および安全性を評価した。主要評価項目の成績は以下である。

1. sCr はプラセボ群（平均±SD：2.8±0.7 が 3.2±1.3 mg/dl に変化）では 180 日後に有意（p=0.0030）に上昇したが，BPS 群（平均±SD：2.4±0.7 が 2.5±0.7 mg/dl に変化）では有意な上昇はみられなかった（p=0.92）。Day 180 時点の群間差は有意であった（0.8 mg, 95 % CI: 0.2~1.3 mg/dl, p=0.0071）。
2. IP/Ca 比はプラセボ群（平均±SD：0.46±0.10 が 0.52±0.21 に変化）では有意（p=0.0037）に上昇したが，BPS 群（平均±SD：0.50±0.08 が 0.51±0.11 に変化）で有意な上昇は認められなかった（p=0.30）。Day 180 時点の群間差は有意ではなかった（0.08, 95 % CI: -0.08~0.096, p=0.85）。
3. USG はいずれの群においても有意な変化はなかった。

副次評価項目

1. プラセボ群の BUN は 180 日後に有意に上昇したが（平均±SD：46.0±11.9 が 57.4±24.4 mg/dl に変化，p<0.001），BPS 群（平均±SD：40.5±13.2 が 43.1±16.1 に変化）では有意な上昇を示さなかった（p=0.94）。Day 180 時点の群間差は有意であった（14.3 mg, 95%CI：3.4~25.2 mg/dl, p=0.015）。
2. UPC 比についてはいずれの群においても有意な変化は起こらなかった。
3. 臨床活動性スコアは，プラセボ群が低下あるいは悪化したのに対して BPS 群は改善あるいは有意に改善した。
4. QOL の評価では BPS 群がプラセボ群と比べて有意に改善した。有害事象は，治療に関係があると判定された有害事象はプラセボ群の 1 例であった。CBC および血液化学検査において臨床的に関連性のある変化はなかった。自然発症 CKD ネコに対して BPS を長期間連日経口投与した結果，腎臓機能の低下を抑制し，臨床症状を改善させる効果が認められた。ま

た有害事項も認められず安全性が確認された。

以上の様に，本研究はネコの CKD に対する BPS の臨床応用の可能性を検討する目的で実施した。第Ⅱ章で BPS がネコの CKD の病態である尿細管障害および尿細管間質障害を抑制することを病理組織学的に確認した。第Ⅲ章では BPS の安全な経口的，連続的 BPS 投与可能量は，30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bid}$. (60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)であると結論した。第Ⅳ章では，第Ⅲ章の結果を基にして自然発症 CKD ネコ 5 頭に対して BPS 150 $\mu\text{g}/\text{head}$ を 180 日間に亘る長期投与を実施し安全性と有効性を検討した。その結果，BPS は CKD ネコへの安全性と腎臓機能への有効性ならびに尿毒症症状を長期間に亘り改善し，安全性が確認された。第Ⅴ章では第Ⅲ章で設定した BPS の投与量を基に実際の臨床治療を想定して，CKD ネコに対する安全性をより求めるために BPS 投与量を 55 $\mu\text{g}/\text{head}$ に設定した。そして自然発症 CKD ネコ 31 頭に対して 180 日間連日経口投与を実施し，有効性と安全性を検討した。その結果，BPS は臨床症状を改善し，腎臓機能の低下を抑制し有害事項は認められなかった。

結論として BPS は，CKD ネコに対して腎臓機能の低下を抑制し，臨床症状を改善させる効果が認められた。その結果，BPS の CKD ネコに対する安全性と有効性が確認され CKD ネコの進展を遅らせることが判明した。これまで CKD ネコに対する有効な治療手段を模索したが，BPS の経口連続投与はネコの CKD 治療法の 1 つの選択肢とし，未来に向けた明るい一歩となるであろうと考えられる。

謝 辞

本論文作成にあたり，終始懇切丁寧なるご指導をいただきました岩手大学小動物病態内科学研究室の佐藤れえ子教授に心より感謝の意を表します。

また，貴重なご助言をいただきました帯広畜産大学の猪熊 壽教授，東京農工大学の福島隆治教授，岩手大学の片山泰章准教授，岐阜大学の西飯直仁准教授に深謝いたします。

本研究に，ご協力いただきました獣医師の皆様には感謝申し上げます。鳥越慎吾先生，大山敦子先生，林 周平先生，高橋 徹先生，近藤厚先生，久保拓也先生，初見 学先生，斎藤志保里先生，吉田明子先生，関 健太郎先生，立花 徹先生，土田靖彦先生，竹原和孝先生，飯塚義之先生，米澤 覚先生，吉岡 努先生，門屋美知代先生，高橋大記先生，服部 幸先生，作佐部有人先生，作佐部浩子先生，牛草貴博先生，真下忠久先生，西田幸司先生，佐藤正勝先生，佐川涼子先生，麻生暁秀先生，安保美乃里先生，網本昭輝先生および八村寿恵先生に感謝申し上げます。また統計学のご助言いただきました岡田清伸氏にも感謝申し上げます。

最後に長年に亘りご助言いただきました動物臨床医学研究所理事長の山根義久博士、学位取得にご理解をいただいた竹中動物病院のスタッフに深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Akiba, T., Miyazaki, M., Toda N (1986). Vasodilator actions of TRK-100, a new prostaglandin I₂ analogue. *Br. J. Pharmacol.* 89, 703~711.
- 2) Araki, H., Lefer, A.M. (1980). Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am. J. Physiol.* 238, H176~181.
- 3) Baer, P.G., Kauker, M.L. and McGiff, J.C. (1979). Prostacyclin effects on renal hemodynamic and excretory functions in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 294~297.
- 4) Balint, G.A. (1998). Possible role of endogenous prostacyclin in the maintenance of hepatic integrity in rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* 50, 1~9.
- 5) Barst, R.J., McGoon, M., McLaughlin, V., Tapson, V., Rich, S., Rubin, L., Badesch, D., Rayburn, B.K., Flinchbaugh, R., Sigman, J., Arneson, C., Jeffs, R. (2003). Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41(12), 2119~2125.
- 6) Brown, C.A., Elliott, J., Schmiedt, C.W., Brown, S.A. (2016). Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses, *Vet Pathol.* Mar 53 (2), 309~26
- 7) Chakrabarti, S., Syme, H.M., Brown, C.A., Elliott, J. (2013). Histomorphometry of feline chronic kidney disease and correlation with markers of renal dysfunction. *Vet. Pathol.* 50, 147~155.
- 8) Chakrabarti, S., Syme, H.M. and Elliott, J. (2012). Clinicopathological variables predicting progression of azotemia in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 275~281.

- 9) Cohen, S.D., Kimmel, P.L. (2007). Nutritional status, psychological issues and survival in hemodialysis patients. *Contrib. Nephrol.* 155, 1~17.
- 10) Cooper, L.T. (2003). Beraprost for the treatment of intermittent claudication. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1679~1686.
- 11) Cowgill, L.D. (2003). Advanced therapeutic approaches for the management of uremia--'the met and unmet needs'. *J. Feline. Med. Surg.* 5, 57~67.
- 12) Crisp, M.S., Chew, D.J., DiBartola, S.P. (1989). Peritoneal dialysis in dogs and cats: 27 cases (1976-1987). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195,1262~1266.
- 13) DiBartola, S.P., Rutgers, H.C., Zack, P.M., Tarr, M.J. (1987).
Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats : 74 cases (1973-1984). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 1196~1202.
- 14) Elliott, J., Barber, P.J. (1998). Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J. Small. Anim. Pract.* 39, 78~85.
- 15) Fine, L.G., Orphanides, C., Norman, J.T. (1998). Progressive renal disease : the hypoxia hypothesis . *Kidney. Int. Suppl.* 65 , S74~8.
- 16) Fu, Q., Colgan, S.P., Shelly, C.S. (2016). Hypoxia : The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clin. Med. Res.* 14 , 15~39.
- 17) Fujita, T., Fuke, Y., Satomura, A., Hidaka, M., Ohsawa, I., Endo, M., Komatsu, K., Ohi, H. (2001). PGI₂ analogue mitigates the progression rate of renal blood flow without glomerular hyperfiltration in patients with chronic renal insufficiency . *Prostaglandins Leucot Essent Fatty Acids.* 65, 223~227.

- 18) Fujiwara, K., Mochida, S., Ohno, A., Arai, M., Matsui, A., Masaki, N., Hirata, K., Tomiya, T., Yamaoka, M., Nagoshi, S. (1995). Use of prostaglandin I₂ analog in treatment of massive hepatic necrosis associated with endothelial cell injury and diffuse sinusoidal fibrin deposition. *Dig. Dis. Sci.* 40, 41~47.
- 19) Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J.L., Vizza, C.D., Kneussl, M., Manes, A. (2002). Arterial Pulmonary Hypertension and Beraprost European (ALPHABET) Study Group. Effects beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 1496~1502.
- 20) Geddes, R.F., Elliott, J. and Syeme, H.M. (2015). Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and survival time in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1494~1501.
- 21) Glassock, R.J., Brenner, B.M. (1987). Major glomerulopathies. In: E. Braunwald (Ed). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 11, 1073~1083.
- 22) Hill, G.S. (2008). Hypertensive nephrosclerosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17, 266~270.
- 23) Hosaka, K., Iwagaya, Y., Suzuki, H., Kojima, T., Kudo, M., Yoshinaka, K. (1989). Acute and subacute toxicity study with beraprost sodium in dogs. *Kiso-to-Rinsho (in Japanese)* 23, 3456~3490.
- 24) Ii, M., Hoshiga, M., Fukui, R., Negoro, N., Nakakoji, T., Nishiguchi, F., Kohbayashi, E., Ishihara, T., Hanafusa, T. (2002). Beraprost sodium

regulates cell cycle in vascular smooth muscle cells through cAMP signaling by preventing down-regulation of p27 (Kip 1). *Cardiovasc. Res.* 52, 500~508.

- 25) International Renal Interest Society. (2015). IRIS Staging of CKD.
- 26) IRIS treatment recommendations for CKD in cats. (2015). [Internet]. Available from: <http://www.irs-kidney.com/guideline/recommendations.html>. Accessed on November 1, 2016.
- 27) 石田卓夫 (2001). 内分泌および脂質疾患. (本好茂一) 小動物の臨床栄養学, 第4版 pp.967~977. 学窓社, 東京
- 28) 伊藤亮, 岡崎啓幸, 寺島幸男, 梅原平治, 青山行雄, 斉藤勝弘. 吉中一朗, 土屋吉則(1989). Beraprost Sodium のマウスおよびラットにおける急性毒性試験. 基礎と臨床 23, 5~14.
- 29) Kainoh, M., Nishio, S., Nakadate, T. (1992). Cytoprotective action of beraprost sodium against peroxide-induced damage in vascular endothelial cells. *Pharmacology.* 45, 61~70.
- 30) Kato, R., Uji, Y., Matsumoto, K. (1989). Phase I study of beraprost sodium (TRK-100), a prostacyclin derivative-single oral administration study (in Japanese). *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 20, 515~527.
- 31) Kato, R., Uji, Y., Matsumoto, K. (1989). Phase I study of beraprost sodium (TRK-100), a prostacyclin derivative - Repeated oral administration study for 10 days (in Japanese). *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 20, 529~539.

- 32) King, J.N., Gunn-Moore, D.A., Tasker, S., Gleadhill, A., Strehlau, G. (2006). Benazepril in Renal Insufficiency in Cats Study Group. Tolerability and efficacy of benazepril in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 1054~1064.
- 33) King, J.N., Tasker, S., Gunn-Moore, D.A.(2007). Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 906~916.
- 34) Klahr, S., Morrissey, J. (2002). Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* 283, F861~875.
- 35) Kmiec, Z. (1994). Prostaglandin cytoprotection of galactosamine-incubated hepatocytes isolated from young and old rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 717, 216~225.
- 36) Krawiec, D.R. (1996). Managing gastrointestinal complications of uremia. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 26,1287~1292.
- 37) Kunieda, T., Nakanishi, N., Matsubara, H., Ohe, T., Okano, Y., Kondo, H.(2009). Effects of long-acting beraprost sodium (TRK-100STP) in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *Int. Heart J.* 50, 513~529.
- 38) Kushiro, M., Shikata, K., Sugimoto, H., Shikata, Y., Miyatake, N., Wada, J., Miyasaka, M., Makino, H. (1998). Therapeutic effects of prostacyclin analog on crescentic glomerulonephritis of rat. *Kidney Int.* 53 (5), 1314~1320.
- 39) Langston, C.E., Cowgill, L.D., Spano, J.A (1997). Applications and outcome of hemodialysis in cats: a review of 29 cases. *J. Vet. Intern. Med.* 11, 348~355.

- 40) Lees, G.E., Brown, S.A., Elliott, J., Grauer, G.E., Vaden, S.L. (2004). American College of Veterinary Internal Medicine. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J. Vet. Intern. Med.* 19, 377~385.
- 41) Lievre, M., Morand, S., Besse, B., Fiessinger, J.N., Boissel, J.P. (2000). Oral beraprost sodium a prostaglandin I₂ analogue, for intermittent claudication : a double-blind, randomized, multicenter controlled trial. Beraprost et Claudication Intermittente (BARCI) Research Group. *Circulatio.* 102, 426~431
- 42) Lulich, J., Brien, O., Osborne, T., Plozin, C. (1992). The Compendium Continuing Education. 14 , 127~152.
- 43) Melian, E.B. and Goa, K.L. (2002). Beraprost: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of peripheral arterial disease and pulmonary arterial hypertension. *Drugs* 62, 107~133.
- 44) Mishima, K., Baba, A., Matsuo, M., Itoh, Y., Oishi, R. (2006). Protective effect cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1564~1577.
- 45) Mishima, E., Fukuda, S., Shima, H., Hirayama, A., Akiyama, Y., Takeuchi, Y., Fukuda, N.N., Suzuki, C., Yuri, A., Kikuchi, K., Tomioka, Y., Ito, S., Soga, T., Abe, T. (2015). Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 1787~1794.

- 46) Miyata, M., Ueno, Y., Sekine, H., Ito, O., Sakuma, F., Koike, H., Nishio, S., Nishimaki, T., Kasukawa, R. (1996). Protective effect of beraprost Sodium. a stable prostacyclin analogue. in development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27, 20~26.
- 47) Mizutani, H., Koyama, H., Watanabe, T., Kitagawa, H., Nakano, M., Kajiwara, K., King, J.N. (2006). Evaluation of the clinical efficacy of benazepril in the treatment of chronic renal insufficiency in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 1074~1079.
- 48) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxidases to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature (Lond)* 263, 663~665.
- 49) Murakami, M., Watanabe, M., Furukawa, H. and Nakahara, H. (2005). The prostacyclin analogue beraprost sodium prevents occlusion of bypass grafts in patients with lower extremity arterial occlusive disease: a 20-year retrospective study. *Ann. Vasc. Surg.* 19, 838~842.
- 50) Murata, T., Murai, T., Kanai, T., Ogaki, Y., Sanai, K., Kanda, H. (1989). General pharmacology of beraprost sodium. 2nd communication: effect on the autonomic, cardiovascular and gastrointestinal systems, and other effects. *Arzneimittelforschung.* 39, 867~876.

- 51) Nagaya, N., Uematsu, M., Okano, Y., Satoh, T., Kyotani, S., Sakamaki, F., Nakanishi, N., Miyatake, K., Kunieda, T. (1999). Effect of orally active prostacyclin analogue on survival of outpatient with primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 1188~1192.
- 52) Nangaku, M. (2002). Final common pathways of progression of renal Disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 6, 182~189.
- 53) Nangaku, M. (2006). Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17,17~25.
- 54) Nasrallah, R., Hebert, R.L. (2005). Prostacyclin signaling in the kidney. implications for health and disease. *A.M. J. Physiol Renal Physiol.* 289, F235~246.
- 55) Nath, K. A .(1988). Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Pharmacol.*47, 1~10.
- 56) Nath , K.A. (1992).Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* 20, 1~17.
- 57) National Kidney Foundation (2002) .K/DOQ clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. *Am. J. Kidney Dis.* 39, S1~266.
- 58) Nishio, S., Matsuura, H., Kanai, N., Fukatsu, Y., Hirano, T., Nishikawa,N., Kameoka, K., Umetsu, T. (1988). The in vitro and ex vivo antiplatelet effect of TRK-100, a stable prostacyclin analog, in several species. *Jpn. J. Pharmacol.* 47, 1~10.

- 59) Niwa, T. (2010) . Uremic toxicity of indoxyl sulfate. Nagoya J. Med.Sci.72, 1~11.
- 60) Nolin, TD., Frye, R.F., Matzke, G.R. (2003). Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. Am. J. Kidney. 42, 906-25.
- 61) Nony, P., Ffrench, P., Girard, P., Delair, S., Azoulay, S., Girre, J.P., Dechavanne, M., Boissel, J.P. (1996). Platelet-aggregation inhibition and hemodynamic effects of beraprost sodium, a new oral prostacyclin derivative: a study in healthy male subjects. Can. J. Physiol Pharmacol. 74, 887~893.
- 62) Ogata, Y., Ishidoya, S., Fukuzaki, A. , Kaneto, H., Takeda, A. , Ohyama ,C., Orikas, S., Arai, Y. (2002). Upregulated expression of transforming growth factor-beta, type IV collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA are decreased after release of unilateral obstruction. Tohoku J. Exp. Med. 197, 159~168.
- 63) Ohta, S., Nakamuta, M., Fukushima, M., Kohjima, M., Kotoh, K., Enjoji, M., Nawata, H. (2005). Beraprost sodium, a prostacyclin (PGI) analogue, ameliorates concanavalin A-induced liver injury in mice. Liver. Int. 25, 1061~1068.
- 64) Ohtomo, S., Nangaku, M., Izuhara, Y., Takizawa, S., Strihou, Cv., Miyata, T., (2008). Cobalt ameliorates renal injury in an obese, hypertensive type 2 diabetes rat model. Nephrol Dial Transplant. Apr;23(4), 1166~72.
- 65) 小野武年 (2006). 視床下部と辺縁系. (小澤澗司) 標準生理学, 第 6 版 pp.440~441. 医学書院, 東京

- 66) Otsuka, H., Akashi, H., Murohara, T., Okazaki, T., Shintani, S., Tayama, K., Sasaki, K., Imaizumi, T., Aoyagi, S. (2006). The prostacyclin analog beraprost sodium augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by autologous bone marrow cells. *Ann. Vasc. Surg.* 20, 646~652.
- 67) Owada, A., Suda, S., Hata, T. (2002). Effect of long-term administration of prostaglandin I₂ incipient diabetic nephropathy. *Nephron.* 92, 788~796.
- 68) Polzin, D.J., Osborne, C.A., Lulich, J.P. (1996). Diet therapy guidelines for cats with chronic renal failure. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 26, 1269~1275.
- 69) Polzin, D.J. (2013). Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 23, 205~215.
- 70) Pruijm, M., Milani, B., Pivin, E., Podhajska, A., Vogt, B., Stuber, M., Burnier M., (2018). Reduced cortical oxygenation predicts a progressive decline of renal function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 93(4), 932~940.
- 71) Ramezani, A., Massay, Z.A., Meijers, B., Evenepoel, P., Vanholder, R., Raj, D.S. (2016). Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am. J. Kidney Dis.* 67, 483~98.
- 72) Risdon, R.A., Sloper, J.C., De Wardener, H.E. (1968). Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet.* 2, 363~366.

- 73) Ross, S.J., Osborne, C.A., Kirk, C.A., Lowry, S.R., Koehler, L.A., Polzin, D.J. (2006). Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic kidney disease in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 949~957.
- 74) Ross, L.A. (1989). Fluid therapy for acute and chronic renal failure. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 19, 343~359.
- 75) Saito, K., Itoh, R., Kudo, N., Kitagawa, N., Hikita, S., Nishimura, C., Okuda, T., Aoyama, Y., Nakamura, T., Kitada, S., Okawa, T., Takemura, K., Yoshinaka, I. (1989). Three-month subacute oral toxicity study of beraprost sodium in rats. *Kiso-to-Rinsho (in Japanese)* 23, 3412~3452.
- 76) Sato, N., Kaneko, M., Tamura, M. and Kurumatani, H. (2010). The prostacyclin analog beraprost sodium ameliorates characteristics of metabolic syndrome in obese Zucker (fatty) rats. *Diabetes.* 59, 1092~10100.
- 77) Sent, U., Gossl, R., Elliott, J., Syme, H.M., Zimmering, T. (2015). Comparison of efficacy of long-term oral treatment with telmisartan and benazepril in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1479~1487.
- 78) Sim, A.K., McCraw, A.P., Cleland, M.E., Nishio, S., Umetsu, T. (1985). Effect of a stable prostacyclin analogue on platelet function and experimentally-induced thrombosis in the microcirculation. *Arzneimittelforschung.* 35, 1816~1818.
- 79) Sinic, Z., Turan, T., Demir, S., Yilmaz, U., Sert, S., Aybek, Z. (2005). The effect of partial unilateral ureteral obstruction release and allopurinol

- on the renal mal-ondialdehyde and glutathione levels. *Int. J. Urol.* 12, 990~993.
- 80) Sparkes, A.H., Caney, S., Chalhoub, S., Elliot, J., Finch, N., Gajanayake, I., Langston, C., Lefebvre, H.P., White, J., Quimby, J. (2016). ISFM consensus guidelines on the diagnosis and management of feline chronic kidney disease. *J. Feline. Med. Surg.* 18, 219~239.
- 81) Syme, H.M., Markwell, P.J., Pfeiffer, D., Elliott, J. (2006). Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 528~535.
- 82) Takenaka, M., Machida, N., Ida, N., Satoh, R., Kurumatani, H., Yamane, Y.(2009). Effect of beraprost sodium(BPS) in a new rat partial unilateral ureteral obstruction model. *Prostaglandins, Leucot. Essent. Fatty Acids.* 80, 263~267.
- 83) 竹中雅彦 (2010). ベラプロストナトリウム (BPS) によるネコの慢性腎臓病の治療. *日本獣医腎泌尿器学会誌* 2, 19~25.
- 84) Takenaka, M., Takashima, K., Kurumatani, H., Ida, N., Sato, R., Yamane, Y. (2011). Safety Assessment of a Prostacyclin Derivative (Beraprost sodium) in Healthy Cats. *J. Anim. Clin. Med.* 20, 131~139.
- 85) 竹中雅彦 (2019). CKD の治療薬ー現在と未来・ベラプロストナトリウム. *日本獣医腎泌尿器学会誌* 11, 4~12.
- 86) Tang, W.H., Wang, Z., Kennedy, D.J., Wu, Y., Buffa, J.A., Agatista-Boyle, B., B Li, X.S., Levison, B.S., Hazen, S.L. (2015). Gut microbiota-

- dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ. Res.* Jan. 30, 116(3), 448-55.
- 87) Tang, W.H. , Wang, Z., Levison, B.S., Koeth, R.A., Britt, E.B., Fu, X., IlchoWu, Y., Hazen, S.L. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 25, 1575 ~1584.
- 88) Thornhill, B.A ., Burt, L,E,, Chen, C., Forbes, M. S., Chevalier, R. L. (2005). Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat. a new model of ureteropelvic junction obstruction. *Kidney Intern.* 67, 42 ~52.
- 89) Toda, N. (1988). Beraprost Sodium. *Cardiovascular Drug Reviews.* 6, 222 ~238.
- 90) Toray Industries. (1999). Oral preparation of prostacyclin (PGI₂) derivative - Dorner tablets 20 mg; beraprost sodium prescribing information.
- 91) Ulm, A.H., Miller, F. (1962). An operation to produce experimental reversible hydronephrosis in dogs. *J. Urol.* 88 , 337~341.
- 92) Umetsu, T., Murata, T., Tanaka, Y., Osada, E., Nishio, S.(1987). Antithrombotic effect of TRK-100, a novel, stable PGI₂ analogue. *Jpn. J. Pharmacol.* 43, 81~90.
- 93) Vanholder, R., Argiles, A., Baurmeister, U. (2001). Uremic toxicity: present state of the art. *Int. J. Artif. Organs.* 24, 695~725.

- 94) Watanabe, M., Nakashima, H., Mochizuki, S., Abe, Y., Ishimura, A., Ito, K., Fukushima, T., Miyake, K., Ogahara, S., Saito, T. (2009). Amelioration of diabetic nephropathy in OLETF rats by prostaglandin I (2) analog, beraprost sodium. *Am. J. Nephrol.* 30, 1~11.
- 95) Wen, J.G. (2002). Partial unilateral ureteral obstruction in rats. *Neurourol Urodyn.* 21, 231~50.
- 96) Wen, J.G., Frokiaer, J., Jorgensen, T.M., Djurhuus, J.C. (1999). Obstructive nephropathy, an update of the experimental research. *Urol. Res.* 27, 29~39.
- 97) Wong, J., Piceno, Y.M., DeSantis, T.Z., Pahl, M., Andersen, G.L., Vaziri, N.D. (2014). Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am. J. Nephrol.* 39, 230~237.
- 98) Yabuki, A., Mitani, S., Fujiki, M., Misumi, K., Endo, Y., Miyoshi, N., Yamato, O. (2010). Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. *Res. Vet. Sci.* 88, 294~299.
- 99) Yamada, M., Sasaki, R., Sato, N., Suzuki, M., Tamura, M., Matsushita T, Kurumatani, H. (2002). Amelioration by beraprost sodium, a prostacyclin analogue, of established renal dysfunction in rat glomerulonephritis model. *Eur. J. Pharmacol.* 449, 167~176.
- 100) Yamaguchi, S., Goto, Y., Sato, N. (2013). Beraprost sodium suppresses progression of chronic renal failure by protecting renal capillary endothelial cells and improving renal hypoxia in glomerulonephritis rats[Abstract]. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 868.

- 101) Yamaguchi, S., Inada, C., Tamura, M., Sato, N., Yamada, M., Itaba, S., Okazaki, S., Matsuura, H., Fujii, S., Matsuda, F., Goto, Y., Mochizuki, H., Kurumatani, H. (2013). Beraprost sodium improves survival rates in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis and 5/6 nephrectomized chronic kidney disease rats. *Eur. J. Pharmacol.* 714, 325~331.
- 102) Yamashita T, Shikata K, Matsuda M, Okada S, Ogawa D, Sugimoto H, Wada J, Makino H (2002). Beraprost sodium, prostacyclin analogue, attenuate glomerular hyperfiltration and glomerular macrophage infiltration by modulating esNOS expression in diabetic rat. *Diabetic Res. Clin. Pract.* 57, 146~161.
- 103) Yano ,T., Ito, Y., Kubota, T., Sendo, T., Koyama, T., Fujita, T., Saeki, K ., You, A., Oishi, R. (2005). A prostacyclin analog prevents radiocontrast nephropathy via phos-phorylation of cyclic AMP response element binding protein. *Am. J. Pathol.* 166, 1333~1342.
- 104) Yokoyama, C., Yabuki, T., Shimonishi, M., Wada, M., Hatae, T., Ohkawara, S., Takeda, J., Kinoshita, T., Okabe, M., Tnabe, T. (2002). Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation.* 106, 2397~2403.