

イヌでのアルドステロン・ブレイクスルー
の発生に関する研究

(Study on occurrence of aldosterone breakthrough in dogs)

酒谷 篤

イヌでのアルドステロン・ブレイクスルー
の発生に関する研究

(Study on occurrence of aldosterone breakthrough in dogs)

酒 谷 篤

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成 28 年入学

(指導教授：竹村直行)

令和 2 年 3 月

目 次

第1章	序論	1
第2章	イヌでの薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化 に対するアラセプリルの抑制効果の検討	5
2.1	緒言	6
2.2	材料および方法	6
2.3	結果	8
2.4	考察	15
2.5	小括	16
第3章	イヌでの薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化 に対するテルミサルタンの抑制効果の検討	17
3.1	緒言	18
3.2	材料および方法	18
3.3	結果	21
3.4	考察	28
3.5	小括	30
第4章	イヌでの薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化 に対するアラセプリルと併用したミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の 効果の検討	31
4.1	緒言	32
4.2	材料および方法	34
4.3	結果	37
4.4	考察	49
4.5	小括	53

第5章 糸球体疾患のイヌにおけるアルドステロン・ブレイクスルーの発生に関する 検討	54
5.1 緒言	55
5.2 材料および方法	56
5.3 結果	57
5.4 考察	60
5.5 小括	62
第6章 総括	63
参考文献	69
謝辞	80

第1章

序 論

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) の活性化は、心臓病および腎臓病の初期段階では有効な代償機構であり、血行動態を改善する方向に働く。RAAS の最終産物であるアルドステロンは、全身の組織に広く分布しているミネラルコルチコイド受容体 (MR) に作用し、水・電解質バランスの調節を含む様々な生理学的役割を担っている。しかし、心不全または慢性腎臓病 (CKD) などの条件下では、MR の発現量は増加し、そしてアルドステロンなどの因子をリガンドとする MR の病的活性化が生じると考えられている [21,61,71]。こうした機序により、アルドステロンによる心臓、血管および腎臓のリモデリングが生じ、臓器障害が引き起こされる。そのため、これらの疾患に対する内科療法としてアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) を使用した RAAS 抑制療法があり、その有益性は医学領域だけでなく獣医学領域でも多く報告されている [6,25,34,39,78-80]。

イヌでは、粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) が最も一般的な後天性心疾患であり、発咳、運動不耐性、そして肺水腫へと病勢は悪化する [39]。MMVD は不可逆的に進行する病態であるため、心不全徴候の緩和および疾患の進行遅延を目的として ACE 阻害薬が使用される [25,39,78-80]。また、イヌに多発する糸球体疾患は CKD の 1 つであり、そして著しい持続的な蛋白尿を引き起こす [49]。蛋白尿は CKD の負の予後因子であるため、糸球体疾患のイヌでは蛋白尿を軽減することで疾患の進行を防ぐことを目的として ACE 阻害薬およびまたは ARB を使用した RAAS 抑制療法が実施される [34,36]。

こうした薬剤を使用した RAAS 抑制療法の初期には、血中または尿中アルドステロン濃度は抑制されるが、長期投与するとアルドステロンはその抑制から逃れ、そして上昇する、いわゆるアルドステロン・ブレイクスルー (ABT) が報告されている [4,5,13,14]。ABT の発生メカニズムは十分には解明されていない。ヒトでは、ABT はベースライン値またはカットオフ値に対する単一の血中アルドステロン濃度に基づき定義されている [13]。すなわち、RAAS 抑制療法開始後の血中アルドステロン濃度がベースライン時 (ACE 阻害薬およびまたは ARB 療法の開始前) の血中アルドステロン濃度と比較して増加した場合、あるいは健康な被験者のサンプルから得られた血中アルドステロン濃度のカットオフ値を上回った場合を ABT と定義している。いっぽう、イヌでの ABT の定義は、24 時間尿中アルドステロン排泄量の指標である尿中アルドステロン・クレアチニン比 (U-Aldo:C) に基づいている [3-5]。ヒトと同様、ベースライン値またはカットオフ値 (1.0

µg/g) に従って定義されている^[3-5]。しかし、ABT の定義および診断基準は現状では統一されていない。ABT の発生率は、ヒトでは10%–53%と報告されている^[13]。これに対して、イヌでのABTの発生率は8%–65%と報告されており、ヒトとほぼ同等である^[4,5]。薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いた研究では、ACE 阻害薬の投与期間は約1週間であり^[4]、より長期間での評価が必要だと思われる。その理由としては、ヒトで報告されている最も早いABTの発生が薬剤投与の4週間後であること、そしてACE阻害薬またはARBによる抗蛋白尿効果が得られるまでには、少なくとも数週間を要する可能性があるためである^[13]。そして、イヌでのABTは薬剤誘発性RAAS活性化モデルだけでなく、ACE阻害薬で治療を受けているMMVDのイヌでも認められている^[5]。しかし、CKDのイヌではABTが発生するかどうかは調査されていない。

医学領域では、ABTが疾患の悪化と関連することが報告されている。ACE阻害薬を服用していた本態性高血圧または心不全のヒトでは、ABTが心エコー図検査で評価した左室肥大、そして運動耐性の悪化と関連した^[19,20,65]。また、ACE阻害薬およびまたはARBを服用していた糖尿病性腎症またはIgA腎症のヒトでは、ABTを経験した患者では経験しなかった患者よりも尿中蛋白排泄率が顕著に高かった^[33,66]。また、ARBであるロサルタンを服用していた糖尿病性腎症のヒトのうち、ABTを経験した患者では、糸球体濾過量の低下がより急速だった^[67]。こうしたABTによる疾患の悪化は、アルドステロンによる体液量の変化に起因するのではなく、上述したMRを介したアルドステロンによる組織リモデリングおよび臓器機能障害が原因である可能性がある^[11]。いっぽう、イヌではABTが疾患の悪化と関連するかどうかを調査した研究は存在しない。

ABTの詳細な発生機序は明らかになっていないが、考えられる要因には、不十分なACE活性阻害(臨床的に不十分な薬剤投与量)、非ACE経路を介したアンジオテンシンII(Ang II)の合成(組織RAAS、キマーゼ依存性のAng II産生)、Ang IIタイプ1受容体の抑制による血中Ang II濃度の増加、そしてAng II以外のアルドステロン刺激因子(例えば、副腎皮質刺激ホルモン、エンドセリン-1)の関与などが含まれる^[13]。また、Ang IIの生成に対するACEおよびキマーゼの関与の割合は、動物種によって異なることが解っている(ヒト:ACE 30%, キマーゼ 70%; イヌ:ACE 70%, キマーゼ 30%)^[54]。そのため、ACE阻害薬によるRAASの抑制効果は、ヒトおよびイヌで異なる可能性がある。

ACE 阻害薬および ARB を長期間にわたり使用した RAAS 抑制療法では、ABT が問題となる。そのため、臓器保護薬としてのミネラルコルチコイド受容体拮抗薬 (MRA) の重要性が注目されるようになった。心不全または CKD のヒトでは、スピロノラクトンやエプレレノンなどの MRA を既存の治療薬に追加すると有益であることが報告されている [24,57,58,62,87]。いっぽう、イヌでもスピロノラクトンの臓器保護効果に関する報告がある。心不全の MMVD のイヌでは、通常的心不全療法にスピロノラクトンを追加投与すると、心臓関連死および心不全の悪化リスクが有意に低下した [12]。また、無徴候の MMVD のイヌで行われたスピロノラクトンの効果に関する予備的検討では、左心拡大を抑制する可能性があることが報告されている [31]。こうした知見に基づく、アルドステロンはヒトと同様、イヌの生命予後にも悪影響を及ぼすと考えられる。しかし、イヌでの MRA の臓器保護効果を検討した文献は上述の 2 つであり、推奨投与量さえ明確に設定されていないのが現状である。

そこで本研究の第 2 章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、ACE 阻害薬であるアラセプリルを長期的に投与した場合の RAAS 抑制効果を検討した。すなわち、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いた以前の研究と比較して、より長期間投与した場合の ACE 阻害薬の RAAS 抑制効果を評価した。続いて第 3 章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬でのテルミサルタンの RAAS 抑制効果を検討した。すなわち、これまでイヌでは全く検討されていない ARB の RAAS 抑制効果について評価した。そして、第 4 章では薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、アラセプリルおよび MRA の併用による臓器保護効果を評価した。最後に第 5 章では、糸球体疾患のイヌでの ABT の発生について検討した。

第2章

イヌでの薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-
アルドステロン系の活性化に対する
アラセプリルの抑制効果の検討

2.1 緒言

イヌでは粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) の発生が多く、その標準療法としてアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬が用いられており、その有益性は多くの臨床試験で実証されている [25,39,78-80]。ACE 阻害薬の 1 つであるアラセプリルは、投与後に生体内で脱アセチル化によりデアセチルアラセプリル、さらに脱フェニルアラニン化によりカプトプリルに代謝される。カプトプリルは ACE を阻害することで動静脈を拡張させる。デアセチルアラセプリルは動脈血管壁に移行し、末梢交感神経の活性化を抑制することで血管拡張作用を示す [29,53]。また、デアセチルアラセプリルおよびカプトプリルが有するスルフヒドリル (SH) 基は、活性酸素の直接的な除去作用を示す [68]。アラセプリルのような SH 基を有する ACE 阻害薬は血管内皮での一酸化窒素の合成を増加させ、酸化ストレスを低下させることが報告されており [68]、血管内皮機能障害、そして血管リモデリングの予防および改善に有用な可能性がある。

ACE 阻害薬であるベナゼプリルおよびエナラプリルを使用した際の RAAS 抑制効果に関しては、薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) 活性化モデル犬での総説がある [4]。しかし、この総説で取り上げられている研究での薬剤投与期間は最長で 17 日であり、ヒトで報告されているアルドステロン・ブレイクスルー (ABT) の最も早い発生が薬剤投与 4 週間後であること、そして ACE 阻害薬またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) による抗蛋白尿効果が得られるまでには数週間を要する可能性があることを考慮した場合、より長期間での評価が必要である。また、アラセプリルでの RAAS 活性化に対する抑制効果は明らかにされていない。そこで本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、アラセプリルが長期間にわたり RAAS を十分に抑制するかどうかを評価することを目的とした。なお、本章の内容は既に *Journal of Veterinary Cardiology* に公表済みである [64]。

2.2 材料および方法

供試動物

供試動物には、日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室第二で管理していた臨床的に健康な雌のビーグル犬 5 頭を用いた。イヌの平均年齢は 3.6 (SD: 2.3) 歳齢、そして平均

体重は9.9(SD: 1.3) kg だった. なお, 本章の研究は本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 25 継-13).

研究プロトコル

各イヌに 1 週間の馴化期間後, 血圧および心拍数記録用のテレメトリーシステム (PowerLab, ADInstruments, Nagoya, Japan) の埋め込み手術を実施した. イヌは金属製ケージで個別に管理し, 一定の明暗周期 (点灯は 6 時, 消灯は 22 時) のもと, 新鮮な水を自由に飲める状態にし, 市販のドライフードを 1 日 2 回 (8 時および 20 時) 与えた. 次項で述べる手術後に 2 週間の安定化期間を設けた後, 各イヌに低血圧誘発性の RAAS 活性化を生じさせるためにアムロジピン (0.5 mg/kg, q12 h: 8 時および 20 時, PO) を 14 日間投与した. その翌日からアラセプリル (1.5 mg/kg, q12h: 8 時および 20 時, PO) を追加投与した.

アムロジピン投与前 (-14 日目), アムロジピン投与 14 日後 (ベースライン, BL), そしてアラセプリル併用投与後の 1, 7, 14, 28 および 56 日目に血圧 (収縮期血圧, SBP; 平均血圧, MBP; 拡張期血圧, DBP), 心拍数 (HR) および尿中アルドステロン・クレアチニン比 (U-Aldo:C) を評価した.

血圧および HR の評価

全てのイヌに対して全身麻酔下で大腿動脈分枝にカテーテルを挿入し, 血圧および HR 記録用のテレメトリー送信機を臍部皮下に埋め込んだ. 血圧および HR に対するこの手術の影響を除外するために, 術後 2 週間にわたって安定化期間を設けた. この期間中は, 全てのイヌは前述した金属製ケージで個別に管理した. 血圧および HR は, 無麻酔無拘束下にてラジオテレメトリーシステムによりパソコンに連続記録した. その後, 各評価日の 13 時から 16 時に記録した測定値を統計解析のために取得した. なお, 興奮などによる極値が認められた場合は, その測定値は除外した.

U-Aldo:C

U-Aldo:C 測定用に 5 mL の尿を 1 日 1 回 (採取時刻は 16 時), 各イヌからカテーテルにより採集した. 各サンプルは採集直後に -40°C で凍結し, そして後日, U-Aldo:C 測定

のために検査センター (ASKA Pharmaceutical Medical Co., Ltd., Kawasaki, Japan) に提出した。

統計解析

全ての測定値を BL からの変動率 [%] に変換した。統計解析は市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24.0 (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan), そして R version 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカル・ユーザー・インターフェイスである EZR version 1.40 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用して実施した^[38]。アムロジピン投与前および BL の各項目の比較には Wilcoxon の符号付順位検定, そしてアラセプリル投与後の各項目の変動は Kruskal–Wallis 検定および Steel 検定を用いて評価した。なお, $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

2.3 結果

テレメトリーシステムの埋め込み術は全てのイヌで成功した。また, 全てのイヌでテレメトリーシステム設置による有害反応は認められなかった。

血圧および HR

各評価日での血圧および HR の測定値を表 2-1 および 2-2 に示した。なお, 研究期間を通じて全てのイヌで低血圧の徴候 (無気力, 脱力など) は認められなかった。

アムロジピン投与前および BL での各項目の比較

U-Aldo:C はアムロジピン投与後に有意に上昇した ($P=0.04$)。また, U-Aldo:C の BL からの差の中央値は $1.35 \mu\text{g/g}$ および 115 %であった (それぞれ実測値および変動率)。

アラセプリル投与後の各項目の変動の評価

アラセプリル投与後の各項目の変動を表 2-3, 図 2-1 および 2-2 に示した。SBP は 14 日目以降に上昇傾向を示し, 28 日目でその上昇は有意だった ($P = 0.02$)。MBP および

DBP も上昇傾向を示した (表 2-3). HR はアラセプリル投与後に低下傾向を示し, 14 日目以降ではその低下は有意だった ($P=0.02$, 表 2-3). UAldo:C は BL と比較して 14 および 28 日目に有意に減少したが (それぞれ $P=0.03$ および $P=0.02$), 56 日目には上昇し, その差は有意でなくなった ($P=0.32$, 表 2-3 および図 2-1). また, 個体毎に U-Aldo:C の推移を評価した場合, 5 頭中 2 頭 (Dog 3 および 4) のイヌの U-Aldo:C が BL 値を上回っていた (図 2-2). なお, このうち 1 頭のイヌ (Dog 3) でアラセプリル投与 14 日目の尿サンプルが得られなかったため, この日の U-Aldo:C の測定はできなかった.

表 2-1. 各評価日における血圧の測定値.

評価日 (日目)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
-14	135 (123-160)	100 (86-120)	75 (62-91)
BL	124 (118-135)	86 (82-98)	61 (46-73)
1	123 (117-142)	84 (80-102)	61 (58-77)
7	120 (109-141)	84 (74-99)	60 (52-75)
14	129 (116-145)	89 (80-101)	67 (58-75)
28	126 (122-145) *	88 (85-99)	66 (62-72)
56	129 (115-152)	90 (79-104)	67 (58-79)

データは中央値 (最小-最大) で表示 (n = 5).

BL, ベースライン; DBP, 拡張期血圧; MBP, 平均血圧; SBP, 収縮期血圧.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

表 2-2. 各評価日における HR の測定値.

評価日 (日目)	HR (bpm)
-14	125 (110-165)
BL	127 (100-169)
1	114 (98-176)
7	107 (93-177)
14	92 (81-115) *
28	87 (79-128) *
56	89 (75-105) *

データは中央値 (最小-最大) で表示 (n = 5).

BL, ベースライン; HR, 心拍数.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

表 2-3. アラセプリル投与後の各項目の変動.

項目	BL 値との差				
	1 日目	7 日目	14 日目	28 日目	56 日目
SBP (mmHg)	-1	-4	5	2*	5
MBP (mmHg)	-2	-2	3	2	4
DBP (mmHg)	0	-1	6	5	6
HR (mmHg)	-13	-20	-35 *	-40 *	-38 *
U-Aldo:C (µg/g)	-1.42	-1.01	-1.49 *	-1.30 *	-1.64

BL 値との差は, 差の中央値として表示した (n = 5).

BL, ベースライン; DBP, 拡張期血圧; HR, 心拍数; MBP, 平均血圧; SBP, 収縮期血圧;

U-Aldo:C, 尿中アルドステロン・クレアチニン比.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

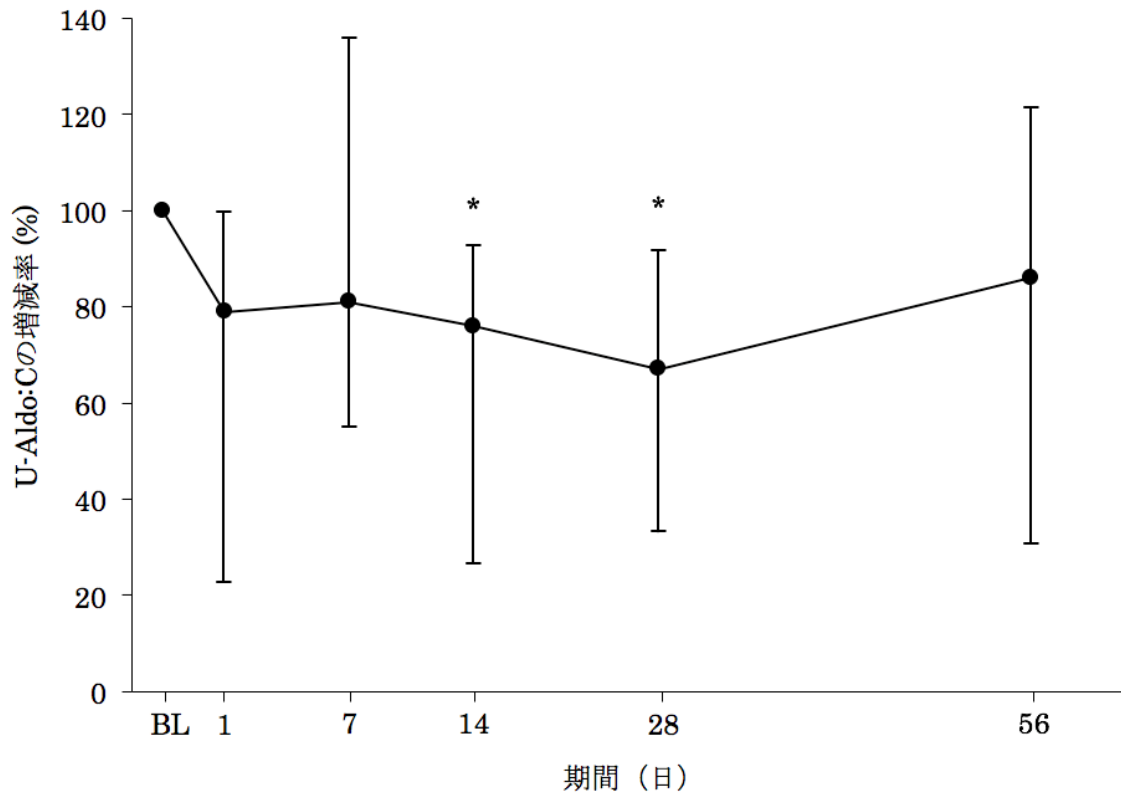


図 2-1. 全てのイヌでの U-Aldo:C の増減率 (%) の経時的変化 (n = 5). U-Aldo:C (%) は, BL 値と比較してアラセプリル投与後 14 および 28 日目で有意に減少したが (それぞれ $P=0.03$ および 0.02), 56 日目には上昇し, 有意差を示さなくなった ($P=0.32$), (BL, 100%; 1 日目, 79%; 7 日目, 81%; 14 日目, 76%; 28 日目, 67%; 56 日目, 86%). * BL 値と比較して $P<0.05$. データは中央値 (最小-最大) で表示. BL, ベースライン; U-Aldo:C, 尿中アルドステロン・クレアチニン比.

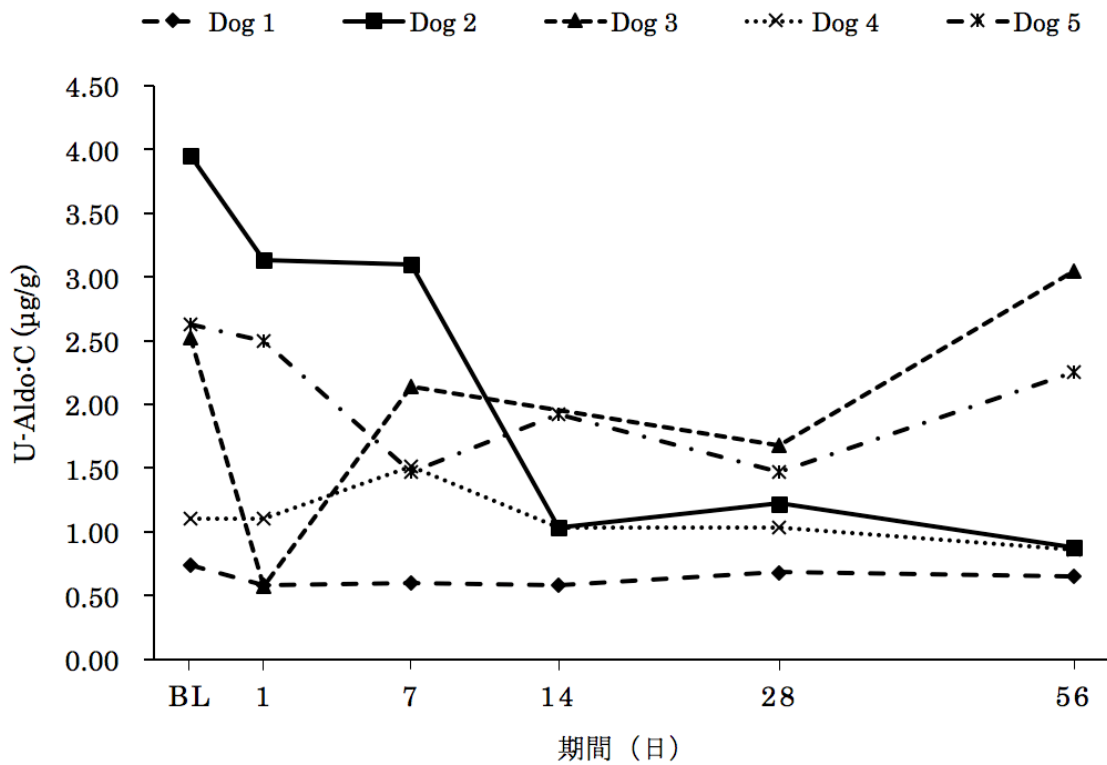


図2-2. 全てのイヌでの U-Aldo:C (µg/g) の経時的変化 (n = 5). Dog 3 および 4 において、アラセプリル投与後に BL 値を上回る U-Aldo:C の増加が認められた (Dog 3: BL, 2.52 µg/g; 56 日目, 3.05 µg/g; Dog 4: BL, 1.10 µg/g; 7 日目, 1.51 µg/g). データは中央値 (最小-最大) で表示. BL, ベースライン; U-Aldo:C, 尿中アルドステロン・クレアチニン比.

2.4 考察

アラセプリル投与後に HR は低下した。軽度から中等度の心不全のヒトでは、アラセプリルは血漿アンジオテンシン II (Ang II) 濃度を減少させ、さらに動脈圧反射機能を改善させることが報告されている^[41]。したがって、アラセプリルは頻脈性不整脈に対して特に優れた効果を発揮する可能性がある。また、実験的に誘発した僧帽弁逆流を有するイヌでの他の研究では、アラセプリルはエナラプリルと比較して1日総 HR を有意に低下させることが報告されている^[35]。このことは、交感神経の抑制に関しては、エナラプリルよりもアラセプリルの方が優れていることを示唆している。したがって、本章での HR の低下はアラセプリルの活性代謝物であるデアセチルアラセプリルの陰性変周期作用による可能性が高いと思われる^[55,75]。しかし、実験プロセスまたは環境などに対するイヌの順応に起因した可能性にも留意すべきと考えられる。

U-Aldo:C は、アラセプリル投与後の 14 および 28 日目で有意に減少した。しかし、U-Aldo:C は 56 日目には上昇し、そして BL 値と比較して有意差を示さなくなった。このことは、イヌでの RAAS 活性化に対するアラセプリルの抑制効果がそれほど長期間持続するものではないことを示している。これらの結果に対して、少なくとも可能性のある説明が 2 つある。第 1 に、本章では評価日の 16 時に 1 回のみ採取したスポット尿で U-Aldo:C を測定した。U-Aldo:C は 24 時間尿中アルドステロン排泄量の指標とされているが、より連続的なアルドステロンの分泌および排泄を正確に評価するためには 24 時間採取した尿での尿中アルドステロン濃度の測定が望ましいと思われる^[9]。第 2 に、アルドステロン・ブレイクスルー (ABT) の発生である。本章では 5 頭中 2 頭のイヌで BL 値を上回る U-Aldo:C 値を示した。第 1 章で述べた ABT の BL 値による定義 (RAAS 抑制療法開始後の U-Aldo:C が ACE 阻害薬およびまたは ARB 療法の開始前である BL 時の U-Aldo:C と比較して増加した場合を ABT と定義) に従うと、この 2 頭のイヌでは ABT が発生したと判断される。ABT の考えられる要因には、不十分な ACE 活性阻害 (臨床的に不十分な薬剤投与量)、非 ACE 経路を介した Ang II の合成 (組織 RAAS, キマーゼ依存性の Ang II 産生)、Ang II タイプ 1 受容体抑制による血中 Ang II 濃度の増加、そして Ang II 以外のアルドステロン刺激因子 (例えば、副腎皮質刺激ホルモン、エンドセリン-1) の関与が含まれる^[13]。本章では、アラセプリルの用量 (1.5 mg/kg, q12 h, PO) は製造会社 (DS Pharma Animal Health Co., Ltd., Osaka, Japan) の推奨用量 (1–3

mg/kg, q12-24 h, PO) の範囲内だった。この用量は心拍数を低下させる点では有効だが、RAAS を抑制する上では有効でなかった可能性がある。しかし、高用量の ACE 阻害薬 (エナラプリル, ベナゼプリル) を投与したイヌでの報告では、フロセミド誘発性 RAAS 活性化を抑制する効果はなく、このことは ACE 阻害薬投与後の ABT の発生は用量非依存性であることを示唆している⁴。本章では高用量のアラセプリルでの検討は行っていないため、他の ACE 阻害薬と同様にアラセプリルでの ABT の発生が用量非依存性かどうかは不明だが、薬剤投与量以外の要因によって ABT が発生した可能性は高いと思われる。

本章にはいくつかの制限がある。第 1 に、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を使用したことである。そのため、実際の症例でアラセプリルを使用した場合に、得られる効果が異なる可能性がある。第 2 に、対照群またはクロスオーバーデザインではなかったことである。換言すると各イヌはそれ自身が対照の役割を果たしたため、測定された項目の変化はこうした実験方法に関連している可能性がある。最後に、RAAS の活性化をより厳密に観察するためには、血漿 ACE 活性、血漿レニン活性、そして血漿 Ang II 濃度といったより多くの RAAS 関連パラメータを評価すべきだったかもしれない。しかし、U-Aldo:C はイヌでは信頼できるパラメータであり、RAAS 活性化の指標として適切だと思われる。

2.5 小括

本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、アラセプリルの RAAS 抑制効果を長期的に評価した。

その結果、アラセプリルは RAAS 活性化の指標である U-Aldo:C を一時的には抑制したが、その効果は持続しなかった。すなわち、その持続期間の問題から臨床的に使用する上では課題があることが明らかになった。この時間経過に伴う RAAS 抑制効果の減弱については、ABT の存在を考慮する必要があると考えられた。

第3章

イヌでの薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-
アルドステロン系の活性化に対する
テルミサルタンの抑制効果の検討

3.1 緒言

心不全または糸球体疾患のヒトを対象に行われたアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬およびアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の臨床試験では、これらの薬剤を用いた RAAS 抑制療法により血中アルドステロン濃度は治療を開始して直ちに低下するものの、治療経過に伴い再上昇する現象が報告されている [13]。これは、アルドステロン・ブレイクスルー (ABT) と呼ばれている。イヌでの ABT の発生は、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデルおよび粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) での ACE 阻害薬の投与後に報告がある [4,5]。

テルミサルタンは ARB の 1 種であり、近年獣医療において蛋白尿の治療に用いられている [16,69]。テルミサルタンはアンジオテンシン II (Ang II) タイプ 1 受容体を阻害する作用に加え、Ang II タイプ 2 受容体を刺激する作用を持つ。Ang II による Ang II タイプ 1 受容体の活性化は、血管収縮、細胞増殖作用、そしてアルドステロン分泌を引き起こす。いっぽう、Ang II による Ang II タイプ 2 受容体の刺激は、血管拡張、細胞の増殖および肥大の抑制、そして一酸化窒素の産生をもたらす。ARB は Ang II の産生経路に関係なく、Ang II 受容体に直接的に作用することで Ang II による働きを阻害する。そのため、テルミサルタンを含む ARB は ACE 阻害薬よりも Ang II の作用を抑制する、換言すると ARB により ABT の発生を抑制できる可能性がある。しかし、この可能性はこれまでイヌでは全く検討されていない。そこで本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、ARB であるテルミサルタンが RAAS を抑制するかどうかを評価することを目的とした。なお、本章の内容は既に *Journal of Veterinary Cardiology* に公表済みである [42]。

3.2 材料および方法

供試動物

供試動物には、日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室第二で管理していた臨床的に健康な雌のビーグル犬 5 頭を用いた。イヌの平均年齢は 7.2 (SD: 1.6) 歳齢、そして平均体重は 10.1 (SD: 1.8) kg だった。なお、本研究は本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 28S-48)。

研究プロトコル

各イヌは金属製ケージで個別に管理し、一定の明暗周期（点灯は6時、消灯は22時）のもと、新鮮な水を自由に飲める状態にし、市販のドライフードを1日2回（8時および20時）与えた。各イヌにアムロジピン（0.5 mg/kg, q12h: 8時および20時, PO）を14日間投与し、その翌日からテルミサルタン（1.0 mg/kg, q24h: 8時, PO）を追加し、この併用療法は84日間にわたり実施した。アムロジピン投与前（-14日目）、アムロジピン投与14日後（BL, ベースライン）、そしてテルミサルタン併用後の1, 7, 14, 28, 56および84日目に収縮期血圧（SBP）、心拍数（HR）、血中尿素窒素濃度、血清クレアチニン濃度および血清電解質（ナトリウム、カリウムおよびクロール）濃度、血漿レニン活性（PRA）、そして24時間尿中アルドステロン排泄量（U-Aldo）を測定した。

SBP および HR

SBPの測定にはオシロメトリック法による血圧測定器（Pettrust, Aster Electric Co., Ltd., Yokohama, Japan）を用いた。測定は、アメリカ獣医内科学会の推奨に基づき実施した¹⁴。血圧は全てのイヌで尾根部にて測定し、カフの長さは尾根部の周囲長の約40%、つまりカフサイズは3.05–4.05 cmとした。SBPの変動が20%未満となる3拍の連続した実測値の平均値を算出した。各評価日の7時および16時に血圧測定を実施し、両者の平均値を更に平均化したものを血圧測定値とした。さらに、SBPが80 mmHg未満の場合を低血圧と定義し¹⁸³、そしてこれに関連した臨床所見（無気力、脱力、大腿動脈強度、可視粘膜色および毛細血管再充満時間の異常）の有無を各イヌで確認した。血圧測定と同時に聴診にてHRを測定し、7時および16時の測定で得られた実測値の平均値をHR測定値とした。

血液生化学検査

各評価日のアムロジピン投与の約12時間後、そしてテルミサルタン投与の約24時間後に各イヌから血液サンプルを採取した。血液サンプルをヘパリン管に入れ、遠心分離した後に生化学自動分析装置（Fuji Dry Chem 4000 V, Fuji Film Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて、血中尿素窒素、血清クレアチニン濃度、そして血清電解質（ナトリウム、カリウムおよびクロール）濃度を測定した。

PRA

各評価日での採血および血漿分離は上述した方法と同様に行なった。血漿サンプルは分析まで -30°C で凍結保存した。後日、PRA 測定のために検査センター (FUJIFILM Monolith Co., Ltd., Tokyo, Japan) に血漿サンプルを提出した。なお、PRA の測定には 2 抗体ラジオイムノアッセイ法を用いた。

U-Aldo の測定

各評価日に各イヌから 24 時間尿を採取した。採取開始前に膀胱カテーテルにより膀胱内の尿を完全に抜去し、その後自然排尿できないようバルーン・カテーテルを設置した。そして、4 時間毎にバルーン・カテーテルから膀胱内の尿を可能な限り採取した。24 時間後に膀胱カテーテルにより膀胱内に残った尿を全て採取し、そして 24 時間の総尿量を記録した。1.5 mL の尿サンプルをマイクロチューブに注入し、測定まで -30°C で凍結保存した。

尿サンプルは、固相ラジオイムノアッセイ法 (SPAC-S Aldosterone kit, FUJIREBIO INC., Tokyo, Japan) による尿中アルドステロン濃度測定のために検査センター (FUJIFILM Monolith Co., Ltd., Tokyo, Japan) に提出した。ラジオイムノアッセイの実施前に、尿サンプルは 0.2N 塩酸で処理した。これにより、アルドステロン-18 β -グルクロニドから酸加水分解されることで生じるアルドステロンの測定が可能となった。その後、得られた尿中アルドステロン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) および 24 時間の総尿量 ($\text{mL}/\text{日}$) を乗じることで U-Aldo ($\mu\text{g}/24\text{ h}$) を算出した。なお、本章では、U-Aldo がテルミサルタン投与後に BL 値を上回った場合を ABT と定義した。

統計解析

統計解析は市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24.0 (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan), そして R version 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカル・ユーザー・インターフェイスである EZR version 1.40 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用して実施した^[38]。データの正規性は、Shapiro–Wilk 検定を用いて評価した。アムロジピン投与前および BL での各項目の比較は、対応のある t 検定および Wilcoxon の符号付順位検定

を用いて評価した。また、ABT 発生個体および未発生個体の SBP、血清カリウム濃度および PRA を比較する際にも対応のある t 検定を使用した。テルミサルタン投与後の各項目の変動は、反復測定による分散分析および Friedman 検定を用いて評価し、そしてこれらの検定結果が有意だった場合に post hoc 検定 (Dunnett 検定および Steel 検定) を実施した。なお、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

3.3 結果

SBP および HR

各評価日での SBP および HR の測定値を表 3-1 に示した。HR は BL と比較して、全ての評価日で有意差を示さなかった。SBP はアムロジピン投与後で有意に低下し ($P = 0.036$)、そして BL と比較して 56 日目に有意に低下した ($P = 0.046$)。なお、研究期間を通じて SBP が 80 mmHg を下回った個体はいなかった。そして、全てのイヌで低血圧徴候は認められなかった。

血液生化学検査

各評価日での血液生化学検査の測定値を表 3-2 に示した。血清クロール濃度はアムロジピン投与後に有意に増加したが ($P = 0.039$)、その他の項目では有意差はなかった。なお、研究期間を通じて参考範囲を逸脱した項目はなく、高窒素血症および高カリウム血症を発現した個体はいなかった。

PRA

PRA は BL 値と比較して、テルミサルタン併用後の 1, 7, 28 および 56 日目で有意に増加した (全て $P = 0.04$, 図 3-1)。

U-Aldo

U-Aldo はアムロジピン投与後に有意に増加した (アムロジピン投与前での中央値 0.30, 最小値 0.01, 最大値 0.57, $P = 0.04$)。テルミサルタン投与後で U-Aldo の中央値に有意な変化は認められなかった (Friedman 検定にて $P = 0.241$)。個体毎に変動を比較す

ると、5頭中2頭でABTの発生が認められた(図3-2)。そして、ABT発生個体および未発生個体のRAAS活性化を反映する可能性のあるSBP、血清カリウム濃度およびPRAを比較した。その結果、2群間でこれらの項目に差はなかった(表3-3)。

表 3-1. 全てのイヌでの各評価日における SBP および HR.

評価日 (日目)	SBP (mmHg)	HR (回/分)
-14	129 ± 8 * ¹	96 ± 8
BL	115 ± 11	110 ± 14
1	108 ± 9	111 ± 6
7	101 ± 9	100 ± 10
14	101 ± 8	96 ± 6
28	100 ± 6	89 ± 5
56	97 ± 6 * ²	95 ± 8
84	99 ± 9	94 ± 10

データは平均 ± 標準偏差で表示 (n = 5).

BL, ベースライン; SBP, 収縮期血圧; HR, 心拍数.

* BL 値と比較して $P < 0.05$ (*¹ $P = 0.036$, *² $P = 0.046$).

表 3-2. 全てのイヌでの血液生化学検査の測定値.

評価日 (日目)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
-14	10.9 ± 1.7	0.6 (0.5-0.7)	146 ± 1	4.4 ± 0.2	114 (109-117) *
BL	11.0 ± 1.8	0.6 (0.5-0.9)	147 ± 1	4.2 ± 0.2	116 (110-118)
1	9.8 ± 2.4	0.5 (0.5-0.7)	146 ± 2	4.3 ± 0.3	115 (109-118)
7	12.6 ± 2.7	0.5 (0.5-0.8)	146 ± 1	4.3 ± 0.2	116 (111-118)
14	12.8 ± 1.8	0.6 (0.5-0.8)	147 ± 1	4.4 ± 0.3	116 (112-118)
28	12.0 ± 2.4	0.6 (0.5-0.8)	146 ± 1	4.2 ± 0.3	113 (107-114)
56	12.3 ± 1.4	0.6 (0.5-0.7)	146 ± 1	4.2 ± 0.3	113 (109-115)
84	12.2 ± 2.1	0.6 (0.5-0.7)	146 ± 2	4.3 ± 0.4	115 (111-117)

データは平均 ± 標準偏差および中央値 (最小-最大) で表示 (n = 5).

BL, ベースライン; BUN, 血中尿素窒素; Cre, クレアチニン; Na, ナトリウム; K, カリウム; Cl, クロール.

* BL 値と比較して $P < 0.05$ ($P = 0.039$).

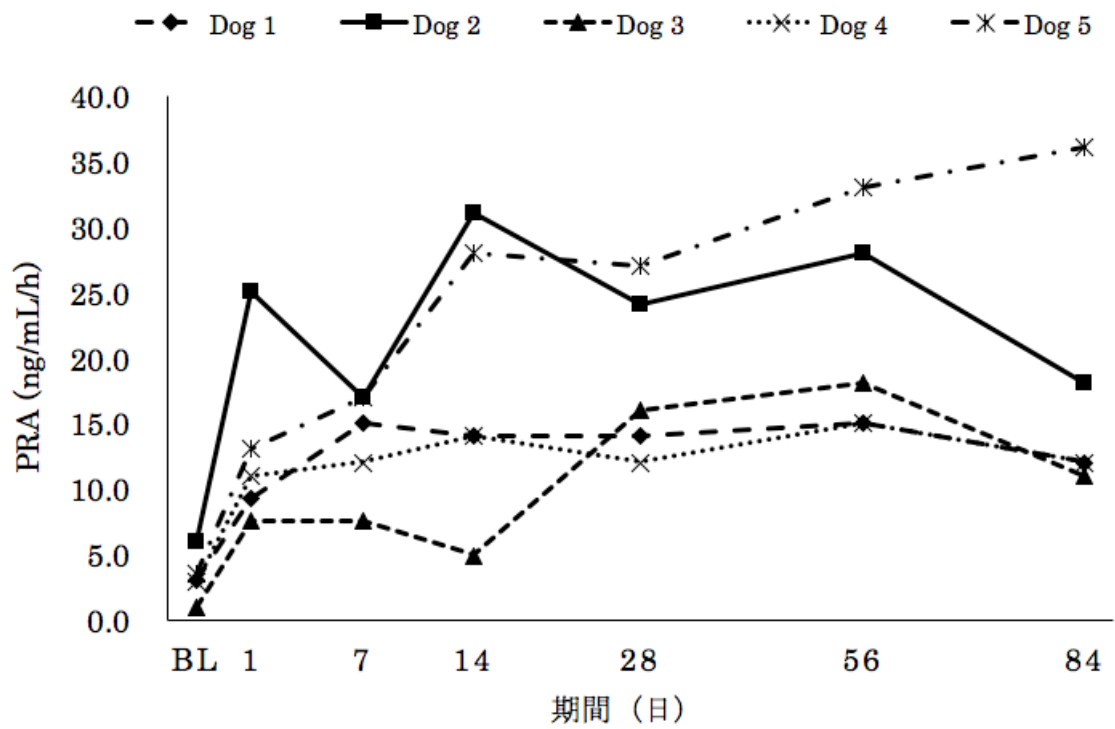


図3-1. 各イヌでのテルミサルタン投与期間中のPRAの経時的変化 (n=5). PRAの平均値は、BL値と比較して、テルミサルタン投与後の1, 7, 28および56日目で有意に増加した (全て $P=0.04$). PRA, 血漿レニン活性.

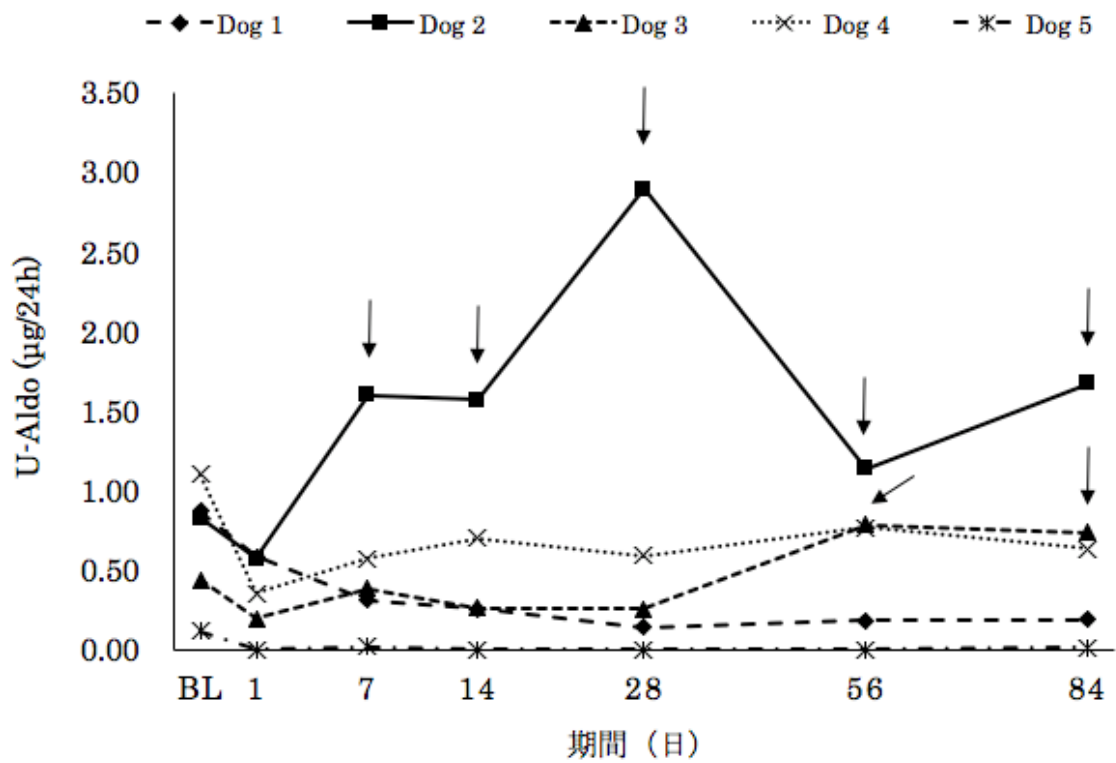


図 3-2. 各イヌでのテルミサルタン投与期間中の U-Aldo の経時的変化. テルミサルタン投与後で U-Aldo の中央値の変動に有意差はなかった (Friedman 検定にて $P=0.241$). Dog 2 および 3 においてアルドステロン・ブレイクスルーの発生が認められた (矢印). U-Aldo, 24 時間尿中アルドステロン排泄量.

表 3-3. ABT 発生個体 (ABT +) および未発生個体 (ABT -) 間の各項目の比較.

	7 日目 ^a		56 日目 ^b	
	ABT +	ABT -	ABT +	ABT -
SBP (mmHg)	95	103 ± 10	98 ± 2	97 ± 8
K (mEq/L)	3.9	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.3
PRA (ng/mL/h)	17	13.0 ± 3.6	23.0 ± 5.0	21.0 ± 8.5

データは平均 ± 標準偏差で表示 (n = 5).

ABT, アルドステロン・ブレイクスルー; SBP, 収縮期血圧; K, 血清カリウム濃度; PRA, 血漿レニン活性.

^a Dog 2 (ABT +) およびその他のイヌ (ABT -) のデータ.

^b Dog 2, 3 (ABT +) およびその他のイヌ (ABT -) のデータ.

3.4 考察

本章では、アムロジピンおよびテルミサルタン (1.0 mg/kg, q24 h, PO) の併用療法は、全てのイヌで良好な耐容性を示した。心臓病およびまたは腎臓病のヒトにおいて、ARB の投与に関連した主な有害作用として、高窒素血症、高カリウム血症および低血圧が挙げられる [10,50]。これに対して、イヌではテルミサルタンを臨床的に使用した場合の有害反応は知られていない [59]。

イヌでは、1 回のみ採取したスポット尿または 1 日 2 回採取した尿で測定した尿中アルドステロン・クレアチニン比 (U-Aldo:C) が U-Aldo, そして RAAS 活性化の指標として使用されている [3-5,30]。しかし、U-Aldo:C と比較して、U-Aldoの方がより連続的なアルドステロンの分泌および排泄を正確に反映する。そのため、本章では、テルミサルタンの RAAS 抑制効果を検討する上で U-Aldo:C ではなく U-Aldo を評価した。

アムロジピン投与後の U-Aldo の有意な増加は、RAAS の活性化を示す。そして、5 頭中 3 頭のイヌでは、テルミサルタンの併用後に U-Aldo は BL 値よりも低下した状態を維持した。いっぽう、残りの 2 頭では U-Aldo は BL 値を上回った。したがって、この 2 頭では ABT が発生し、テルミサルタンによる RAAS の抑制が不十分だったと判断される。ARB はヒトだけでなくイヌでも ABT が発生することが本章の検討により初めて解った。ARB であるロサルタンを服用していた糖尿病性腎症のヒトでは、ABT を経験した患者でより急速な糸球体濾過量の低下が認められた [67]。また、テモカプリルおよびまたはロサルタンを服用していた IgA 腎症のヒトでは、ABT は高い尿中蛋白排泄率と関連した [33]。そのため、ヒトではスピロノラクトンまたはエプレレノンなどのミネラルコルチコイド受容体拮抗薬を ACE 阻害薬または ARB と併用することがあり、蛋白尿の抑制効果を示すことも報告されている [21,22,62]。したがって、第 4 章では ACE 阻害薬にミネラルコルチコイド受容体拮抗薬を併用した場合の臓器保護効果に関して検討した。

本章での ABT の発生率は 40%であった。ヒトでの ABT の発生率は 10%–53%と報告されている [13]。薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いたいくつかの研究を要約した総説では、8%–65%の割合で ACE 阻害薬投与後に ABT が発生すると記載されている [4]。また、MMVD のイヌでは、約 30%の割合で ACE 阻害薬投与後に ABT が発生すると報告されている [5]。したがって、ARB は ACE 阻害薬と比較して RAAS の活性化をより抑制する可能性はあるが、ACE 阻害薬と同様に ABT が発生することが本章の検討によ

り明らかになった。

本章では、ABT 発生個体および未発生個体間での SBP、血清カリウム濃度および PRA を比較したが、これらの項目に差は認められなかった。アムロジピンおよびテルミサルタンの併用療法による血圧の低下は、強力な RAAS の活性化、そして ABT の発生に関与する可能性がある。しかし、ABT 発生個体および未発生個体で血圧低下の程度は同等だった。また、RAAS 抑制療法中の血清カリウム濃度の増加は ABT と関連すると考えられている [82]。しかし、いくつかの研究により、この仮説は支持されていない [5,66]。本章でも同様の所見を示しており、ABT 発生個体および未発生個体で血清カリウム濃度に差はなかった。そして、高用量のエナラプリルを服用した心不全のヒトでは、低用量を服用した患者よりも研究期間を通じて PRA が増加しており、研究最終日の組織 ACE 活性がより高かったという報告があることから [77]、RAAS 抑制療法に反応した循環レニンの過剰産生も ABT の発生要因である可能性がある。本章ではテルミサルタン投与後に PRA が増加したが、ABT 発生個体と未発生個体で明らかな差はなかった。したがって、ARB 投与後の PRA の変動が用量依存性かどうかを評価することが必要だと考えられる。これらの項目以外での ABT の発生要因として、不十分な薬剤投与量が考えられている。すなわち、本章ではテルミサルタンを 1.0 mg/kg、q24h の用量で用いたが、RAAS を抑制する上では不十分だった可能性がある。しかし、高用量の ACE 阻害薬を投与したイヌでの以前の報告では、フロセミド誘発性 RAAS 活性化を抑制する効果はなく、このことは ACE 阻害薬投与後の ABT の発生は用量非依存性であることを示唆している [2]。また、本章ではテルミサルタン投与後に RAAS のフィードバックメカニズムによる PRA の有意な増加が認められている。そのため、テルミサルタンの投与量は十分だったと考えられる。したがって、本章での ABT の発生は薬剤投与量以外の要因によって生じている可能性が高いと思われる。ヒトでの ABT の発生要因として、高い血中 Ang II 濃度、血清副腎皮質刺激ホルモン濃度の増加、そして ACE 遺伝子といった RAAS 関連遺伝子の多型性なども報告されている [13]。しかし、本章ではこれらの要因を評価していない。そのため、本章では ABT の発生に関する要因は特定できなかったが、上述した要因または未知の因子の組み合わせによって発生した可能性がある。

本章には 2 つの制限がある。第 1 に、健康な動物で実験を行っており、かつ薬剤により RAAS の活性化を誘発したため、実際の症例では同じ現象が生じない可能性がある。

第 2 に、薬剤投与を行わない対照群を設けなかったため、ABT を発生したイヌでの U-Aldo の変動が生理的範囲内であった可能性も否定できない。しかし、この可能性は低いと考えられる。その理由として、各個体は同一条件下で管理し、U-Aldo の増加につながる RAAS の活性化が生じる環境要因（ストレスなど）が存在したとは考えにくいためである。

3.5 小括

本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、テルミサルタンの RAAS 抑制効果を評価した。

その結果、U-Aldo の低下は持続して認められず、そして 5 頭中 2 頭のイヌで U-Aldo のさらなる増加を抑制しなかった。すなわち、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬では、テルミサルタンの投与は RAAS を十分に抑制できず、その要因として ABT の発生が関与していることも明らかとなった。そのため、ヒトと同様、イヌで ARB を使用する場合は ABT の存在を考慮する必要があると思われる。

第4章

イヌでの薬剤誘発性レニン-アンジオテンシン-
アルドステロン系の活性化に対するアラセプリル
と併用したミネラルコルチコイド受容体拮抗薬
の効果の検討

4.1 緒言

イヌの粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) および糸球体疾患の標準療法として、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) を使用したレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) 抑制療法がある [25,34,39,78-80]。しかし、RAAS 抑制療法の初期には、血中または尿中アルドステロン濃度は抑制されるが、長期投与にともないアルドステロンはその抑制から逃れ、そして上昇する、いわゆるアルドステロン・ブレイクスルー (ABT) がヒトだけでなくイヌでも認められることが報告されている [45,13]。ACE 阻害薬投与後の ABT は、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬だけでなく、自然発症した MMVD のイヌでも認められている [5]。さらに、第 3 章で示した通り、ARB であるテルミサルタン投与後の ABT の発生が薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬で認められることが明らかになった [42]。すなわち、このことは ACE 阻害薬または ARB の投与だけでは RAAS の活性化を十分に抑制できないことを示している。

心臓、腎臓および血管系の組織リモデリングおよび機能障害は、RAAS の最終産物であるアルドステロンのミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介した作用に起因することが知られている [15]。したがって、臓器保護薬としての MR 拮抗薬 (MRA) の重要性が注目されるようになった。心不全および腎臓病 (糖尿病性腎症, IgA 腎症など) のヒトでは、従来の治療薬 (ACE 阻害薬, ARB など) にスピロノラクトンまたはエプレレノンなどの MRA を併用することの有益性、具体的には心臓関連死のリスクの低下、蛋白尿の軽減などが報告されている [24,43,57,58,62,87]。いっぽう、イヌでのスピロノラクトンの有効性を報じた文献はこれまでに 2 報にすぎない。アメリカ獣医内科学会 (ACVIM) ステージ C または D の MMVD と診断された 212 頭のイヌを対象に実施された対照群を設けた多施設二重盲検試験では、既存療法 (ACEI, 必要に応じて利尿薬およびジゴキシン) にスピロノラクトン (2 mg/kg, q24 h) またはプラセボを投与した。試験期間は約 15 ヶ月間であり、エンドポイントは心臓関連死、僧帽弁逆流に起因する安楽死、そして僧帽弁逆流の重症度の悪化に設定した。その結果、エンドポイントに到達したイヌの割合は、スピロノラクトン併用群で有意に少なかった。また、心臓に起因する死亡リスクは、スピロノラクトンにより 69%低下し、イヌでも良好な結果が得られている [12]。また、無徴候の MMVD のイヌで行われたスピロノラクトンの予備的検討では、心エコー図検査

にて評価した左心拡大を抑制する可能性があることが報告されており、現在臨床試験が継続して行われている^[31]。しかし、留意すべき点は臓器保護薬としてのスピロラクトンの推奨投与量が明確に設定されていないことである。イヌで臓器保護作用の観点からスピロラクトンを投与する上で、**2 mg/kg, q24 h**の用量で十分な効果が得られるのか、あるいはこれを超える用量で投与した場合、更なるメリットが期待できるのか、それとも有害反応の発現リスクが高まるのかどうかは全く検討されていない。

いっぽう、イヌではエプレレノンの有効性に関する報告はない。エプレレノンは、スピロラクトンと比較してMR選択性が高いことが特徴である^[8,56]。そのため、MR以外のプロジェステロン受容体およびアンドロジェン受容体への親和性は低く、ヒトではこうした性ホルモン受容体の阻害による有害反応（例えば、女性化乳房、乳房痛）の発生率が低いことが知られている。冠動脈塞栓モデルのイヌにエプレレノン（**10 mg/kg, q12 h**）を投与した場合、左室機能障害の進行抑制、そして左室リモデリングの抑制効果（サイトカイン遺伝子発現および心筋線維化の抑制）が認められた^[60,74]。また、ペーシング誘発性心不全モデルのイヌでは、エプレレノン（**10 mg/kg, q24 h**）の投与により心室の線維化が抑制されたことが報告されている^[76]。いっぽう、イヌでのエプレレノンの高用量（**15 mg/kg/day**以上）の投与は、前立腺萎縮を引き起こし、前立腺への影響がない用量は**5 mg/kg/day**であることも報告されている^[47]。このように、イヌでのエプレレノンの臓器保護効果を評価した研究は極めて少なく、そのためスピロラクトンとの薬剤効果を比較した報告もないのが現状である。

ガレクチンは、糖鎖認識ドメインを少なくとも1つ有するβガラクトシド結合タンパク質であり、哺乳類では15種類が同定されている^[23]。そのうちの1つであるガレクチン-3（Gal-3）は、全ての免疫細胞（マクロファージ、単球、樹状細胞、好酸球、肥満細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化TおよびB細胞）、上皮細胞、内皮細胞および感覚ニューロンを含む多くの組織で広く発現している。Gal-3は細胞内では核および細胞質に存在し、細胞外に分泌されると細胞表面または細胞外基質内へと移動し、細胞と細胞間または内皮細胞と細胞外基質間の相互作用を仲介している。そのため、Gal-3は細胞の増殖および分化、アポトーシス、そして炎症反応など多様な生物学的反応に関与している^[23]。また、Gal-3は様々な腫瘍（甲状腺癌、リンパ腫など）で発現が増加し、細胞転移に関与することも知られている^[23]。そして、Gal-3は組織線維化に重要な役割を果たして

おり、細胞の表現型を筋線維芽細胞に変化させ、コラーゲン合成を増加させる。高アルドステロン症モデルラットでは、心臓および腎臓での組織 Gal-3 発現の増加が組織線維化および機能障害と関連していることが報告されており、この有害作用はスピロラクトンにより抑制されることも解っている^[17]。MMVD のイヌでは、心筋組織での Gal-3 の発現は心筋線維化と関連し、血漿 Gal-3 濃度は正常犬と比較して有意に高かったことが報告されている^[63]。また、心不全のヒトでは、血清 Gal-3 濃度は核磁気共鳴画像 (MRI) により評価した心筋線維化と関連することが知られており、そして死亡率および入院率を含めた予後指標としての有用性も報告されている^[23,85]。このように、血中および組織中の Gal-3 は組織線維化の指標であり、そして MRA の臓器保護効果を評価する上で有用なマーカーだと考えられる。

以上の報告に基づき、本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、アラセプリルおよび MRA (スピロラクトン, エプレレノン) を併用投与し、臓器保護効果が得られるかどうかを評価することを目的とした。

4.2 材料および方法

供試動物

供試動物には、日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室第二で管理していた臨床的に健康な雌のビーグル犬 5 頭を用いた。イヌの平均年齢は 7.2 (SD: 1.9) 歳齡、そして平均体重は 9.3 (SD: 1.1) kg だった。なお、本章の研究は本学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 29K-75)。

研究プロトコル

本章の研究は前向きクロスオーバー試験とした。各イヌは金属製ケージで個別に管理し、一定の明暗周期 (点灯は 6 時, 消灯は 22 時) のもと、新鮮な水を自由に飲める状態にし、市販のドライフードを 1 日 2 回 (8 時および 20 時) 与えた。各イヌにアムロジピン (0.5 mg/kg, q12 h: 8 時および 20 時, PO) を 14 日間投与し、その翌日にアラセプリル (1.5 mg/kg, q12 h: 8 時および 20 時, PO) および MRA を追加し、この併用療法は

56日間(1-56日目)にわたり実施した。MRAとして、スピロノラクトンおよびエプレレノン投与し、以下に示す4種類の用量で投与した;スピロノラクトン(2 mg/kg, q24 h: 8時, PO または 2 mg/kg, q12 h: 8時および20時, PO), エプレレノン(5 mg/kg, q24 h: 8時, PO または 10 mg/kg, q24 h: 8時, PO)。アムロジピン投与前, アムロジピン投与14日後(ベースライン, BL), 1, 7, 14, 28 および56日目に採血, 採尿および血圧測定を実施した。評価項目は, 血清 Gal-3 濃度, 血液生化学検査項目(血中尿素窒素, クレアチニンおよび電解質), 血清 ACE 活性, 収縮期血圧(SBP), 心拍数(HR), そして尿中アルドステロン・クレアチニン比(U-Aldo:C)とした。

血清 Gal-3 濃度

各イヌから採取した血液サンプルを遠心分離(3000 rpm, 15 分間)後, 分析まで-80°Cにて凍結保存した。後日, 血清 Gal-3 濃度の測定のために検査センター(ASKA Pharmamedical Co., Ltd., Kawasaki, Japan)に血清サンプルを提出した。測定には, イヌの Gal-3 ELISA キット(RayBiotech, Atlanta, USA)を使用した。また, 添加回収分析では, 3種類のイヌの血清に Gal-3 標準溶液を添加し, 添加前後の検体中の Gal-3 濃度を求めた。そして, 回収率(%)は(添加後試料の測定値-無添加試料の測定値)/添加濃度×100の計算式から算出した。なお, 血清 Gal-3 濃度の同時および日差分析間の変動係数は, 血清サンプル1検体の5重測定を3日間実施することで得た。

血液生化学検査

各イヌでの採血および血清分離後の保存は上述した方法と同様に行ない, 血清サンプルを-40°Cで凍結保存した。後日, 血中尿素窒素, クレアチニンおよび電解質(ナトリウム, カリウムおよびクロール)の測定のために検査センター(FUJIFILM Monolith Co., Ltd., Tokyo, Japan)に血清サンプルを提出した。

血清 ACE 活性

各イヌでの採血および血清分離後の保存は上述した方法と同様に行なった。後日, 血清 ACE 活性の測定のために上述した検査センターに血清サンプルを提出した。なお, 測定には, ACE 測定キット(ACE Color, Fujirebio, Tokyo, Japan)を使用した。

SBP および HR

血圧測定にはオシロメトリック法による血圧測定器 (Pettrust, Aster Electric Co., Ltd., Yokohama, Japan) を用いた。測定は, ACVIMの推奨に基づき実施した^[1]。SBPが80 mmHg未満の場合を低血圧と定義し^[83], そしてこれに関連した臨床徴候(無気力, 脱力, 大腿動脈強度, 可視粘膜色および毛細血管再充満時間の異常)の有無を各イヌで確認した。また, HRは聴診にてカウントした。なお, SBPおよびHRは1日1回, 16時に測定した。

U-Aldo:C

U-Aldo:C 測定用に 5 mL の尿を朝 (投薬 1-2 時間後) および夕方 (朝の投薬 8-10 時間後) に各イヌからカテーテルにより収集した。その後, 各個体での朝夕の等量の尿サンプルを混合し, -40°C で凍結保存した。そして後日, この尿検体を検査センター (FUJIFILM Monolith Co., Ltd., Tokyo, Japan) に提出した。なお, 尿中アルドステロン濃度は, 固相ラジオイムノアッセイ法 (SPAC-S Aldosterone kit, FUJIREBIO INC., Tokyo, Japan) により測定した。

統計解析

統計解析は市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24.0 (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan), そして R version 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカル・ユーザー・インターフェイスである EZR version 1.40 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用して実施した^[38]。データの正規性は, Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した。アラセプリルおよび MRA 併用投与後の各項目の変動は, Dunnett 検定および Steel 検定を用いて評価した。また, アラセプリルおよび MRA 併用投与後の各評価日での血清 Gal-3 濃度の比較には, 繰り返しのある 2 元配置分散分析および対応のある t 検定を用いた。なお, $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

4.3 結果

血清 Gal-3 濃度

血清 Gal-3 濃度の平均回収率は 92.9%であった。また、同時および日差分析間の変動係数はそれぞれ 2.54%および 3.84%であった。

スピロラクトン q24 h 群では、BL 値と比較して血清 Gal-3 濃度 (ng/mL) は 1 および 28 日目で有意に低下した (BL 5.07, SD 0.96; 1 日目 3.53, SD 0.54; 7 日目 5.09, SD 1.57, 14 日目 3.82, SD 0.81; 28 日目 3.48, SD 0.80; 56 日目 4.20, SD 0.66; $P=0.041$ および 0.035 , 図 4-1)。また、スピロラクトン q12 h 群では、14 および 28 日目で血清 Gal-3 濃度は有意に低下した (BL 5.61, SD 0.94; 1 日目 5.00, SD 0.79; 7 日目 4.81, SD 0.62, 14 日目 3.35, SD 0.62; 28 日目 3.98, SD 1.19; 56 日目 4.88, SD 1.17; $P=0.001$ および 0.022 , 図 4-1)。また、スピロラクトン q24 h 群は q12 h 群と比較して、1 日目の血清 Gal-3 濃度は有意に低かったが ($P=0.008$)、その他の評価日には差は認められず、研究期間を通じて同様の挙動を示した (図 4-1)。エプレレノン 10 mg/kg 群では、血清 Gal-3 濃度は BL 値と比較して 1, 7, 14, 28 および 56 日目で低下傾向が認められたが、有意差はなかった (BL 5.15, SD 0.89; 1 日目 4.60, SD 1.22; 7 日目 4.75, SD 1.31, 14 日目 4.02, SD 0.59; 28 日目 3.91, SD 1.09; 56 日目 4.45, SD 0.91; 図 4-2)。なお、5 mg/kg 群でも同様に有意差はなかった (BL 4.42, SD 0.62; 1 日目 4.68, SD 0.83; 7 日目 4.29, SD 0.56, 14 日目 4.08, SD 0.90; 28 日目 4.38, SD 1.33; 56 日目 4.87, SD 0.95; 図 4-2)。

血液生化学検査および血清 ACE 活性

スピロラクトン併用投与後における各評価日での血液生化学検査および血清 ACE 活性の測定値を表 4-1 および 4-2 に示した。スピロラクトン q12 h 群では、血清カリウム濃度は BL 値と比較して 1 日目で有意に増加した ($P=0.019$)。また、q12 h 群のイヌのうち 1 頭で 56 日目に高カリウム血症が認められた (血清カリウム濃度 5.5 mEq/L)。なお、研究期間を通じて高窒素血症を発現した個体はいなかった。また、血清 ACE 活性に関しては各評価日で差は認められなかった。

エプレレノン併用投与後における各評価日での血液生化学検査および血清 ACE 活性の測定値を表 4-3 および 4-4 に示した。血清ナトリウム濃度は、エプレレノン 5 mg/kg 群では、BL 値と比較して 1 日目で有意に低下した ($P=0.039$)。血清カリウム濃度は、BL 値と比較して 5 mg/kg 群では 56 日目、そして 10 mg/kg 群では 1, 7, 14, 28 および 56 日目で有意に増加した (5 mg/kg 群, $P=0.022$; 10 mg/kg 群, 1 および 7 日目で $P=0.002$, 14 および 28 日目で $P=0.023$, 56 日目で $P=0.001$)。また、10 mg/kg 群のイヌのうち 1 頭で 7 日目に高カリウム血症が認められた (カリウム濃度 5.5 mEq/L)。なお、研究期間を通じて高窒素血症を発現した個体はいなかった。また血清 ACE 活性は 10 mg/kg 群において、BL 値と比較して 56 日目に有意に増加した ($P=0.008$)。

SBP および HR

スピロラクトン併用投与後における各評価日での SBP および HR の測定値を表 4-5 に示した。スピロラクトン q12h 群では、SBP は BL 値と比較して、28 日目で有意に上昇した ($P=0.011$)。エプレレノン併用投与後における各評価日での SBP および HR の測定値を表 4-6 に示した。エプレレノン 5 mg/kg 群および 10 mg/kg 群の両群では、BL 値と比較して差は認められなかった。なお、研究期間を通じて SBP が 80 mmHg を下回った個体はなく、全てのイヌで低血圧の徴候は認められなかった。

U-Aldo:C

U-Aldo:C はアムロジピン投与前と比較して、アムロジピン投与後に有意に増加した (スピロラクトン投与群: $P=0.017$, エプレレノン投与群: $P=0.009$)。スピロラクトン q24h 群では、BL 値と比較して U-Aldo:C は 1, 14, 28 および 56 日目で有意に増加した (それぞれ $P=0.035$, 0.006, 0.010 および 0.009, 表 4-7)。また q12h 群では、U-Aldo:C は全ての評価日で有意に増加した (全て $P<0.05$)。エプレレノン 5 mg/kg 群では、U-Aldo:C は BL 値と比較して 1, 7, 14, 28 および 56 日目で有意に増加した (1 日目で $P=0.032$, その他の評価日で $P<0.001$, 表 4-7)。また、エプレレノン 10 mg/kg 群では、U-Aldo:C は BL 値と比較して 1 日目以外の評価日で有意に増加した (7 日目で

$P=0.003$, その他の評価日で $P<0.001$, 表 4-7).

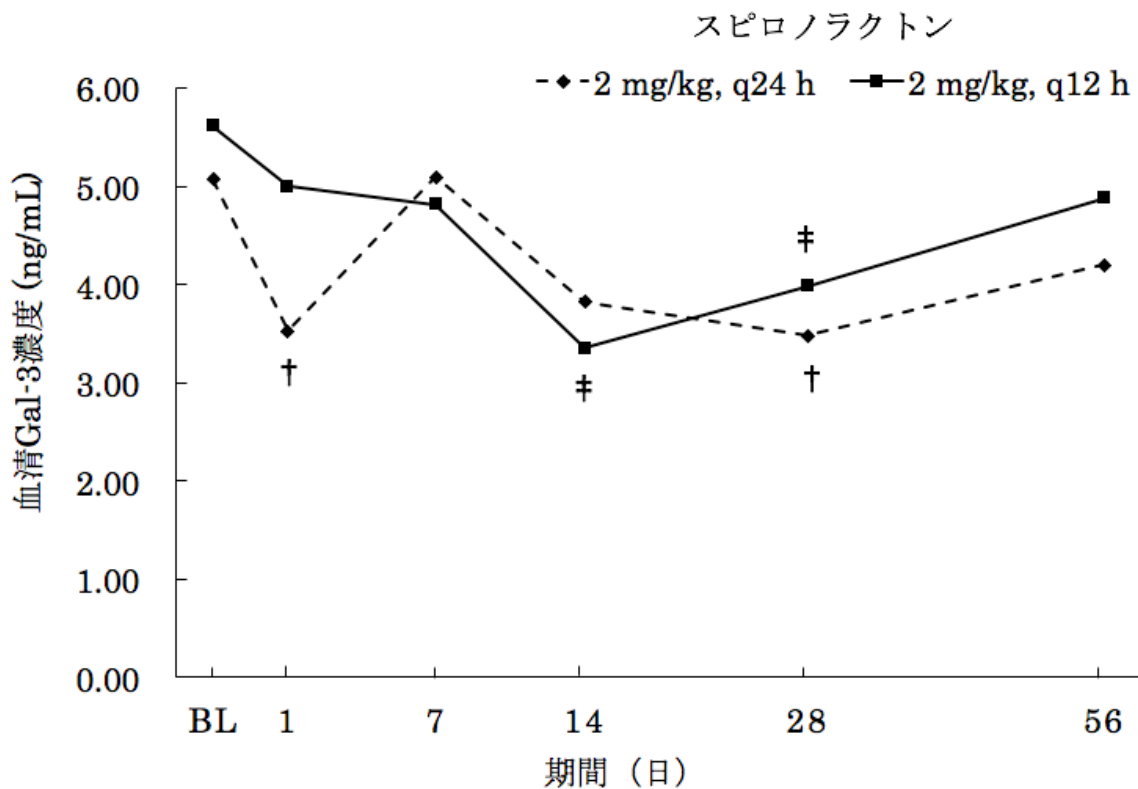


図 4-1. スピロノラクトン併用投与後の血清 Gal-3 濃度の経時的変化 (n = 5).

データは平均値で表示. BL, ベースライン ; Gal-3, ガレクチン-3.

† (q24 h), ‡ (q12 h): BL 値と比較して $P < 0.05$.

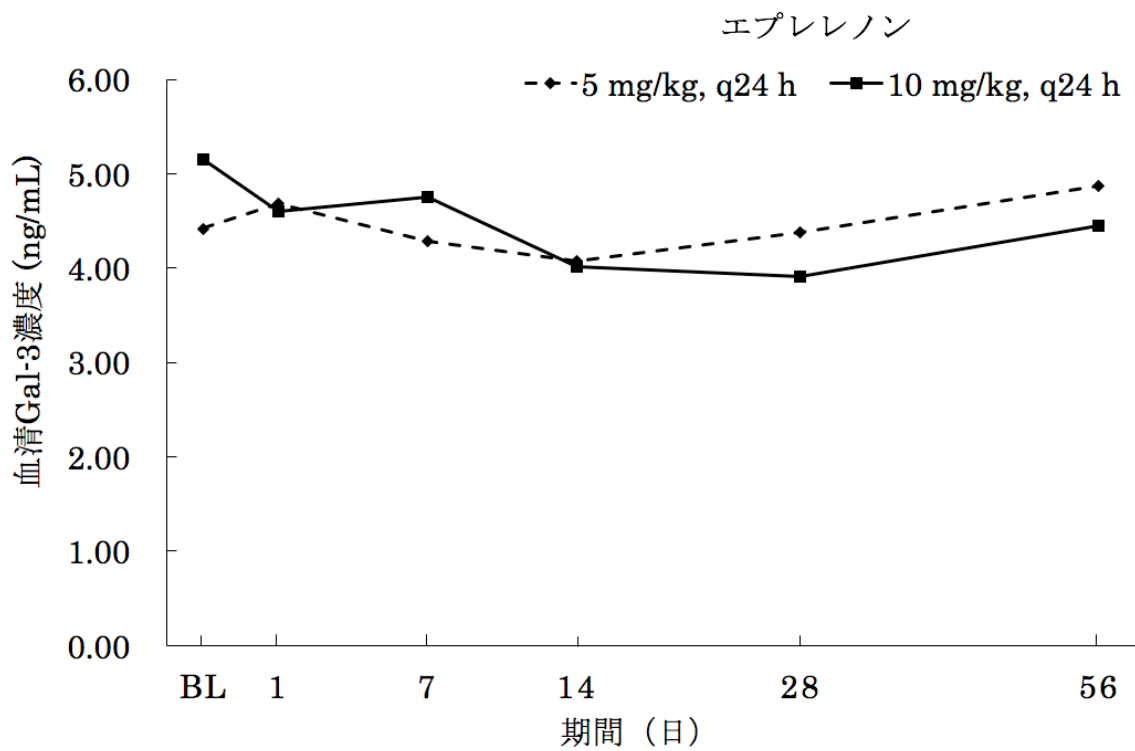


図 4-2. エプレレノン併用投与後の血清 Gal-3 濃度の経時的変化 (n = 5).

データは平均値で表示. BL, ベースライン ; Gal-3, ガレクチン-3.

表 4-1. スピロノラクトン 2 mg/kg, q24 h 投与時の各評価日における血液生化学検査および血清 ACE 活性の測定値.

評価日 (日目)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ACE 活性 (U/L)
BL	12±1	0.7 (0.6–0.9)	145 (145–147)	4.8 (4.3–5.1)	109 (108–110)	5.9 (5.5–11.6)
1	12±1	0.7 (0.7–1.0)	144 (143–147)	5.1 (4.5–5.3)	109 (108–112)	5.2 (4.9–11.1)
7	13±2	0.8 (0.7–1.0)	146 (145–147)	4.7 (4.7–5.2)	110 (109–110)	5.6 (5.5–12.3)
14	13±2	0.8 (0.7–1.0)	145 (139–146)	4.9 (4.4–5.9)	109 (106–111)	6.4 (5.5–13.1)
28	12±2	0.7 (0.5–1.1)	145 (144–147)	4.9 (4.4–5.3)	110 (109–111)	6.5 (5.7–13.2)
56	11±2	0.7 (0.6–1.1)	145 (145–147)	4.9 (4.4–5.3)	110 (109–112)	6.6 (5.9–14.1)

データは平均 ±SD および中央値 (最小–最大) で表示 (n = 5).

ACE, アンジオテンシン変換酵素 ; BL, ベースライン ; BUN, 血中尿素窒素 ; Cre, クレアチニン ;

Na, ナトリウム ; K, カリウム ; Cl, クロール.

表 4-2. スピロノラクトン 2 mg/kg, q12 h 投与時の各評価日における血液生化学検査および血清 ACE 活性の測定値.

評価日 (日目)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ACE 活性 (U/L)
BL	11 ± 2	0.7 (0.7–1.0)	144 ± 1	4.7 ± 0.2	109 (108–109)	5.9 (4.4–10.5)
1	12 ± 2	0.7 (0.6–1.0)	144 ± 2	5.0 ± 0.3 *	109 (107–109)	5.6 (4.7–10.8)
7	12 ± 2	0.7 (0.7–1.0)	143 ± 2	4.8 ± 0.4	109 (104–112)	5.7 (5.2–11.4)
14	12 ± 2	0.7 (0.6–0.9)	144 ± 2	4.9 ± 0.3	109 (107–111)	7.0 (6.4–11.7)
28	13 ± 2	0.7 (0.7–0.9)	144 ± 2	4.9 ± 0.3	109 (109–110)	7.3 (5.5–13.1)
56	12 ± 2	0.7 (0.6–1.1)	146 ± 1	4.9 ± 0.3	110 (109–113)	7.4 (5.7–14.4)

データは平均 ± SD および中央値 (最小–最大) で表示 (n = 5).

ACE, アンジオテンシン変換酵素; BL, ベースライン; BUN, 血中尿素窒素; Cre, クレアチニン;

Na, ナトリウム; K, カリウム; Cl, クロール.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

表 4-3. エプレレノン 5 mg/kg, q24 h 投与時の各評価日における血液生化学検査および血清 ACE 活性の測定値.

評価日 (日目)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ACE 活性 (U/L)
BL	11 (10-15)	0.7 (0.7-1.1)	146 ± 1	4.7 ± 0.2	110 ± 2	5.2 (4.2-10.9)
1	11 (9-14)	0.7 (0.7-1.1)	144 ± 1 *	4.9 ± 0.4	108 ± 2	5.7 (5.2-10.9)
7	12 (9-16)	0.7 (0.6-1.1)	145 ± 1	4.9 ± 0.3	110 ± 2	6.1 (5.4-11.4)
14	11 (11-13)	0.7 (0.7-1.0)	145 ± 1	4.9 ± 0.3	109 ± 2	6.0 (5.1-14.8)
28	12 (10-14)	0.7 (0.6-1.1)	146 ± 1	4.9 ± 0.3	109 ± 2	6.2 (5.3-12.3)
56	12 (10-14)	0.8 (0.6-1.1)	146 ± 2	5.1 ± 0.2 *	109 ± 3	5.8 (5.7-14.0)

データは平均 ± SD および中央値 (最小-最大) で表示 (n = 5).

BL, ベースライン ; BUN, 血中尿素窒素 ; Cre, クレアチニン ; Na, ナトリウム ; K, カリウム ; Cl, クロール.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

表 4-4. エプレレノン 10 mg/kg, q24 h 投与時の各評価日における血液生化学検査および血清 ACE 活性の測定値.

評価日 (日目)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ACE 活性 (U/L)
BL	12±2	0.8 (0.7-1.0)	147 (143-147)	4.6±0.1	109 (107-111)	6.5±3.0
1	12±3	0.8 (0.7-1.1)	145 (142-146)	5.0±0.2 *	109 (105-110)	7.0±3.1
7	13±2	0.7 (0.7-1.1)	145 (144-146)	5.0±0.4 *	109 (106-111)	7.6±3.4
14	13±2	0.8 (0.6-1.1)	145 (143-146)	4.9±0.2 *	111 (106-111)	7.7±2.8
28	13±2	0.8 (0.6-1.1)	146 (142-147)	4.9±0.2 *	109 (105-111)	7.9±4.1
56	12±2	0.7 (0.6-1.0)	144 (142-147)	5.0±0.3 *	109 (104-111)	8.3±3.6 *

データは平均 ±SD および中央値 (最小-最大) で表示 (n = 5).

BL, ベースライン ; BUN, 血中尿素窒素 ; Cre, クレアチニン ; Na, ナトリウム ; K, カリウム ; Cl, クロール.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

表 4-5. スピロノラクトン併用投与後の各評価日における SBP および HR の測定値.

評価日 (日目)	2 mg/kg, q24 h		2 mg/kg, q12 h	
	SBP (mmHg)	HR (bpm)	SBP (mmHg)	HR (bpm)
BL	145 ± 19	138 ± 10	126 ± 16	119 ± 13
1	129 ± 21	126 ± 11	132 ± 8	124 ± 11
7	124 ± 16	129 ± 18	143 ± 16	131 ± 23
14	136 ± 23	126 ± 9	129 ± 16	130 ± 12
28	146 ± 14	125 ± 9	147 ± 15 *	130 ± 21
56	134 ± 11	126 ± 13	137 ± 11	127 ± 14

データは平均 ± SD で表示 (n = 5).

BL, ベースライン ; HR, 心拍数 ; SBP, 収縮期血圧.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

表 4-6. エプレレノン併用投与後の各評価日における SBP および HR の測定値.

評価日 (日目)	5 mg/kg, q24 h		10 mg/kg, q24 h	
	SBP (mmHg)	HR (bpm)	SBP (mmHg)	HR (bpm)
BL	126 (120–147)	118 ± 10	123 (118–155)	128 (116–172)
1	128 (113–160)	114 ± 8	124 (111–159)	140 (100–140)
7	129 (106–141)	117 ± 13	114 (105–151)	128 (116–140)
14	132 (126–183)	136 ± 21	130 (121–154)	112 (100–152)
28	137 (128–157)	131 ± 16	126 (105–156)	140 (104–152)
56	133 (115–161)	126 ± 18	133 (111–148)	128 (116–136)

データは平均 ± SD および中央値 (最小–最大) で表示 (n = 5).

BL, ベースライン ; HR, 心拍数 ; SBP, 収縮期血圧.

表 4-7. スピロノラクトンおよびエプレレノン併用投与後の各評価日における U-Aldo:C ($\mu\text{g/g}$) の測定値.

評価日 (日目)	スピロノラクトン		エプレレノン	
	2 mg/kg, q24 h	2 mg/kg, q12 h	5 mg/kg, q24 h	10 mg/kg, q24 h
BL	1.38 \pm 0.81	1.29 \pm 1.38	1.46 \pm 1.03	1.62 \pm 0.73
1	2.64 \pm 1.61 *	3.32 \pm 0.95 *	3.11 \pm 1.89 *	2.94 \pm 1.35 *
7	2.45 \pm 0.91	4.71 \pm 2.59 *	4.49 \pm 1.95 *	4.43 \pm 0.99 *
14	2.98 \pm 0.98 *	4.63 \pm 1.48 *	4.14 \pm 1.45 *	5.06 \pm 1.72 *
28	2.89 \pm 1.30 *	5.98 \pm 3.20 *	4.86 \pm 1.39 *	5.13 \pm 2.11 *
56	2.92 \pm 1.13 *	5.01 \pm 2.91 *	5.02 \pm 1.90 *	5.90 \pm 1.83 *

データは平均 \pm SD で表示 (n = 5).

BL, ベースライン ; U-Aldo:C, 尿中アルドステロン・クレアチニン比.

* BL 値と比較して $P < 0.05$.

4.4 考察

ヒトまたはマウス由来のマクロファージ細胞株を使用し、アルドステロンおよび組織 Gal-3 発現の関連性を評価した研究では、アルドステロンが MR に結合することで、PI3K/Akt および NF- κ B 経路を介したシグナル伝達機構により組織 Gal-3 が発現することが明らかとなった^[48]。そして、これらのアルドステロンによる組織 Gal-3 の発現は、線維芽細胞での線維化関連因子の発現を増加させることも報告されている^[48]。また、高アルドステロン症モデルラットでも、心臓および腎臓での組織 Gal-3 発現の増加が組織線維化および機能障害と関連していることが報告されており、この有害作用は Gal-3 阻害物質またはスピロノラクトンにより抑制されることも解っている^[18]。さらに、Gal-3 ノックアウトマウスでは、アルドステロンによる心臓および腎臓の組織線維化が生じないことも報告されている^[17]。したがって、組織線維化および臓器機能障害は、MR を介したアルドステロンと組織 Gal-3 発現との直接的な関連により生じる。そのため、MRA の投与によりアルドステロンの MR を介した組織 Gal-3 発現は抑制され、血中 Gal-3 濃度も低下すると考えられる。本章では、アラセプリルおよびスピロノラクトン (2 mg/kg, q24 h または q12 h) の併用療法は、一時的ではあるが血清 Gal-3 濃度を有意に低下させた。したがって、今回設定したスピロノラクトンの用量は、臓器保護効果を得る上で有効である可能性がある。

これに対して、スピロノラクトン 2 mg/kg, q12 h では、q24 h を上回る血清 Gal-3 濃度の抑制効果は認められなかった。そして、q12 h の投与で血清カリウム濃度の有意な増加が認められ、軽度ではあるが高カリウム血症を発現した個体が存在した。ペーシング誘発性心房細動モデルのイヌでは、スピロノラクトンの高用量 (20 mg/kg, q24 h) での投与により、心房および心室の線維化を抑制することが報告されている^[88]。しかし、この研究では電解質を含む血液検査パラメータを評価しておらず、高カリウム血症などの MRA の投与に伴う有害反応の有無は観察されていない。したがって、スピロノラクトンではより高用量の投与で臓器保護効果が得られる可能性があるが、こうした有害反応の発現に注意する必要がある。MMVD のイヌで心不全療法 (ACE 阻害薬に加えて必要に応じてフロセミド、ジゴキシン) にスピロノラクトン (2 mg/kg, q24 h) を追加投与した群とそうでなかった群での有害反応 (食欲不振、活動性の低下、嘔吐・下痢などの消化器症状、心臓病およびまたは腎臓病による死亡、高窒素血症、高カリウム血症など) の発

現率を比較した研究では、両群で発現率に差は認められなかった^[46]。そのため、スピロノラクトン 2 mg/kg, q24 h という用量は安全に使用できると考えられる。ただし、この研究での薬剤使用期間の中央値は 217 (範囲: 2–1,333) 日であり、これよりも長期間使用した場合の有害反応の発現率に関しては不明であるため、この用量で使用する際にも、個々の症例犬で有害反応の有無を定期的にモニタする必要があると思われる。

本章の検討では、スピロノラクトンの投与による血清 Gal-3 濃度の有意な低下は一時的なものであった。このことは、スピロノラクトンの臓器保護効果が持続しない可能性を示唆している。そのため、臓器障害および血中 Gal-3 濃度の関連性を解明するには、血清 Gal-3 濃度を長期的に連続モニタし、組織および機能障害を評価するためのさらなる研究が必要である。しかし、MMVD (ACVIM ステージ C または D) のイヌでは、既存の心不全療法 (ACE 阻害薬に加えて必要に応じてフロセミド, ジゴキシン) にスピロノラクトン (2 mg/kg, q24 h) を追加投与した場合、心臓関連死や心不全の悪化リスクを有意に低下させることが報告されている^[12]。本章と同用量で使用したスピロノラクトンがこれらの臨症例での予後の改善をもたらした要因が 2 つ考えられる。第 1 に、病的状態での MR の活性化である。MR は、心不全または CKD (特に糖尿病性腎症) などの条件下でその発現量が増加し、アルドステロンなどの因子をリガンドとする病的活性化を生じると考えられている^[21,61,71]。そのため、本章で使用した RAAS 活性化モデル犬と比較して自然発症した心不全罹患犬では、MR の過剰発現および活性化が生じていた可能性がある。したがって、MRA の効果がより得られやすい病態にあり、生命予後の改善につながった可能性がある。第 2 に、MR のリガンドであるコルチゾールの影響である。MR はアルドステロンだけでなく、コルチゾールといったグルココルチコイドにも親和性を有している。心筋梗塞モデルラットではコルチゾールの投与により梗塞サイズが拡大し、スピロノラクトンの投与でこれらの作用が抑制されることが報告されている^[51]。また、心不全のヒトで血中コルチゾール濃度および血中アルドステロン濃度と予後の関連性を調査した研究では、アルドステロンと同様に血中コルチゾール濃度の上昇は生命予後の悪化因子であることも解っている^[27]。そして、心不全の病態では血中コルチゾール濃度は上昇し、炎症性サイトカインも関連した蛋白異化亢進バランスの異常が生じることが報告されている^[7]。したがって、心不全罹患犬での MRA の使用は、こうしたコルチゾールによる有害作用を抑制し、予後の改善に関連した可能性がある。本章では MR

の病的活性化および発現量の増加，そしてコルチゾールの影響は評価していないが，本章と同用量で使用したスピロラクソンが過去に報告されている心不全罹患犬で予後が改善したのにはこのような要因が考えられる。

これに対して，アラセプリルおよびエプレレノン（5 mg/kg, q24 h または 10 mg/kg, q24 h）の併用療法は，血清 Gal-3 濃度を有意に低下させなかった。したがって，今回設定したエプレレノンの用量は，臓器保護効果を得る上では十分でなかった可能性がある。エプレレノンは，スピロラクソンと比較して高い MR 選択性を有するものの，アルドステロンによる MR の転写活性化を抑制する効果は弱い（50%阻害濃度が高い）ことが知られている^[8,56]。すなわち，エプレレノンは総合的にスピロラクソンよりも MR 拮抗作用が弱いということが解っている。したがって，エプレレノンの投与により血清 Gal-3 濃度の有意な低下が認められなかったことは，こうしたエプレレノンの弱い MR 拮抗作用が要因であった可能性がある。ペーシング誘発性心不全モデルのイヌでは，本章と同用量（10 mg/kg, q24 h）で使用したエプレレノンの投与が心室の線維化および炎症性サイトカインの発現を抑制したことが報告されている^[76]。上述した通り，心不全の条件下では MR の発現量の増加および病的活性化が生じると考えられていることから，本章でのモデルと比較して，エプレレノンの臓器保護効果がより得られやすい病態にあった可能性がある。血清カリウム濃度に関しては，スピロラクソンでの結果と同様，エプレレノン併用後においても有意な増加が認められた。しかし，冠動脈閉塞モデル犬を用いた報告では，エプレレノン（10 mg/kg, q12 h）の単独投与により血清カリウム濃度の増加は認められなかった^[74]。ACE 阻害薬および MRA の併用療法は，高カリウム血症の発現リスクを増加させることが知られている^[37]。そのため，ACE 阻害薬または ARB への MRA の追加投与では，予後の改善が期待されるものの，こうした有害反応の有無を厳密にモニタすることが重要だと思われる。

血清 Gal-3 濃度を臓器保護効果の指標として連続モニタする上では，その結果の解釈に注意すべき点があることを述べておく。アムロジピン単独投与による薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬 4 頭での血清 Gal-3 濃度の推移を評価した筆者らによる他の未発表データ（薬剤投与期間は 70 日間であり，評価ポイントは本章と同様）では，血清 Gal-3 濃度は各評価ポイントで薬剤投与前と比較して上昇していたが，全てのポイントで有意差を示したわけではなかった。つまり，本章での結果は，こうした血清 Gal-3 濃度の

変動を考慮する必要があると思われる。MRA の臓器保護効果を血中 Gal-3 濃度または組織 Gal-3 の発現程度で評価した過去の報告では、これらの項目を 2 ポイント（つまり、MRA 投与前後）でのみ観察することで MRA の有効性を評価している [17,18,60,74,76]。そのため、組織リモデリングの過程、そして MRA の投与期間中でのこうしたバイオマーカーの挙動を継時的に評価した研究は存在しない。したがって、組織線維化が進展する機序での血中または組織 Gal-3 の関連性を明らかにすることで、MRA の臓器保護効果としての有用性をより明確に評価することができると思われる。

本章では、血清 ACE 活性はスピロラクトン投与群では研究期間を通じて有意な変動が認められず、エプレレノン 10 mg/kg 群では BL 値と比較して 56 日目に有意に増加した。本来ならば、血清 ACE 活性は ACE 阻害薬の投与で抑制される [44,45]。そのため、本章で血清 ACE 活性が増加した要因の 1 つとして、アラセプリルの用量が少なかったことが考えられる。しかし、第 2 章で示した通り、同用量で使用したアラセプリルは薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬で U-Aldo:C を有意に抑制したことに加え、MMVD のイヌで臨床的有効性が報告されている [32]。そのため、今回の血清 ACE 活性の増加はアラセプリルの用量が少なかったためでなく、ACE 阻害薬および MRA を併用した際の RAAS のフィードバックメカニズムに起因していると思われる [81]。

U-Aldo:C は、スピロラクトン投与群およびエプレレノン投与群の両方で BL 値と比較して各評価日で有意に増加した。また、MMVD のイヌでの ABT 発生の有無、あるいはスピロラクトンの有用性を評価した以前の研究においても、スピロラクトン投与群での U-Aldo:C は非投与群と比較して有意に増加したことが報告されている [5,31]。MRA による MR の遮断は、レニン産生を刺激し、アルドステロン分泌を増加させることが解っており、本章での結果もこうした機序に起因するものと思われる [72]。このことは、MRA を使用した場合、U-Aldo:C が RAAS 活性化の抑制の指標として使用できないことを示唆している。ただし、アルドステロンによる組織障害は、アルドステロンが MR に作用することで生じることには留意すべきである。すなわち、MRA の投与によりアルドステロン分泌が増加したとしても、MRA の効果が得られている状況ではアルドステロンによる組織障害は生じないということである。したがって、MRA 投与後での U-Aldo:C の増加は、RAAS 活性化の抑制が不十分であることを示唆するものではない。

本章にはいくつかの制限がある。第 1 に、本章では心臓および腎臓での組織および機

能障害を評価していない。そのため、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬での MRA による血清 Gal-3 濃度の低下が、こうした機能障害の発生および改善と関連したかどうかは不明である。したがって、MRA の臓器保護効果をより正確に評価するためにはさらなる研究が必要である。第 2 に、本章では薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を使用している。本章のモデル犬ではスピロノラクトンの投与で血清 Gal-3 濃度の低下が認められたが、こうした結果が実際の症例犬にスピロノラクトンを投与した際の臓器保護効果または予後の改善と関連するかは知られていない。そのため、症例犬でのスピロノラクトンを投与した場合の血清 Gal-3 濃度と臓器機能障害または予後との関連性を評価するためにデザインされた臨床研究が正当化される。

4.5 小括

本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬において、アラセプリルおよび MRA (スピロノラクトン, エプレレノン) を投与し、MRA による臓器保護効果が得られるかどうかを評価することを目的とした。

その結果、スピロノラクトン 2 mg/kg, q24 h または q12 h の投与で一時的ではあるが血清 Gal-3 濃度を有意に低下させた。したがって、これらの用量で投与した際のスピロノラクトンは臓器保護効果を得る上で有用である可能性がある。これに対して、エプレレノン 5 mg/kg または 10 mg/kg, q24 h の投与では血清 Gal-3 濃度の有意な低下は認められなかった。そのため、エプレレノンをこれらの用量で使用する場合、十分な臓器保護効果を得られない可能性がある。

第5章

糸球体疾患のイヌにおけるアルドステロン・
ブレイクスルーの発生に関する検討

5.1 緒言

糸球体疾患は慢性腎臓病 (CKD) の 1 つであり、著しい持続的な蛋白尿を引き起こすことが重要な特徴である [49]。そして、CKD のイヌでの蛋白尿と疾患の進行および死亡率との関連を評価した研究は、尿蛋白/クレアチニン比 (UPC) が 1.0 以上を示すイヌでは、UPC が 1.0 未満のイヌと比較した場合、腎機能低下の進行が早く、そして生存期間が短かったことを報告している [36]。つまり、蛋白尿は CKD の負の予後因子であるため、糸球体疾患のイヌでは蛋白尿を軽減することで疾患の進行を防ぐことが重要となる [84]。

糸球体疾患のイヌに対する標準療法の 1 つとして、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬およびまたはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) などを使用したレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) 抑制療法がある [34]。しかし、RAAS 抑制療法の初期には、アルドステロン濃度が抑制されるが、長期投与に伴いアルドステロンはその抑制から逃れ、そして上昇する、いわゆるアルドステロン・ブレイクスルー (ABT) が報告されている [4,5,13,42,64]。そして、ACE 阻害薬およびまたは ARB 療法を実施していた CKD (糖尿病性腎症または IgA 腎症) のヒトのうち、ABT を経験した患者では経験しなかった患者よりも顕著に高い尿中蛋白排泄率が認められた [33,66]。また、ARB であるロサルタンを服用していた糖尿病性腎症のヒトでは、ABT を経験した患者でより急速な糸球体濾過量の低下が認められたことが報告されている [67]。ヒトではスピロノラク톤またはエプレレノンなどのミネラルコルチコイド受容体拮抗薬 (MRA) を ACE 阻害薬または ARB と併用すると、蛋白尿の抑制効果を示すことも報告されている [21,22,62]。また、ABT の発生率は、ヒトでは 10%–53% と報告されている [13]。いっぽう、イヌでの発生率は 8%–65% と報告されており、ヒトとほぼ同等である [4,5]。しかし、これらの発生率は薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬、あるいは ACE 阻害薬療法中の粘液腫様変性性僧帽弁疾患のイヌのもので、CKD のイヌでの ABT 発生に関する調査はされていない。

テルミサルタンは ARB の 1 種であり、獣医療においても蛋白尿の軽減を期待して使用されている [16,69]。慢性的な RAAS の活性化は、過剰なアンジオテンシン II (Ang II) およびアルドステロンの生理作用を介して、糸球体の破壊、そして蛋白尿の発現を引き起こす。また、糸球体腎炎のモデルラットでは、ARB の投与による Ang II タイプ 2 受容体の刺激を介して糸球体の濾過障壁の構成に重要な役割を果たしているネフリン蛋白

の発現を改善することが報告されている^[40,52,86]. ARBはAng IIの産生経路に関係なく, Ang II受容体に直接的に作用することでAng IIの作用を阻害する. そのため, キマーゼを介してACE非依存性にAng IIが産生されることも考慮すると, テルミサルタンはACE阻害薬よりもAng IIの作用をより抑制する可能性がある. また, 上述した通り, CKDのイヌでABTが発生するかどうかは過去に検討されていない. そこで本章では, テルミサルタン療法を実施している糸球体疾患のイヌにおいてABTが発生するかどうかを評価することを目的とした.

5.2 材料および方法

症例選択

本検討では, 2014年9月から2018年10月の間に日本獣医生命科学大学附属動物医療センター腎臓科に来院し, 糸球体疾患と診断したイヌのカルテを回顧的に再調査した. 糸球体疾患の診断基準は, 膀胱穿刺法またはカテーテル法で採取した尿を用いてUPCを測定し, その値が1.0以上とした. テルミサルタンの投与期間が少なくとも約3ヶ月間以上であり, そしてテルミサルタン療法開始前後での尿中アルドステロン・クレアチニン比(U-Aldo:C)測定用の尿検体が存在する症例を組み込んだ. また, 副腎皮質機能亢進症または腫瘍性疾患といった蛋白尿を続発する可能性のある疾患に罹患した動物は本研究に含めなかった.

データ収集

対象症例の診療記録を再調査し, シグナルメント(犬種, 性別および年齢), 血液生化学検査(クレアチニン濃度, ナトリウム濃度およびカリウム濃度), 非観血的な収縮期血圧, UPCおよび投薬内容(ACE阻害薬およびまたは血管拡張薬の併用の有無)に関する情報を収集した. これらのデータはテルミサルタン投与開始前(Pre-tel), そしてテルミサルタン投与後の少なくとも約3ヶ月間が経過した時点(Post-tel)の2ポイントで得た. 国際獣医腎臓病研究グループの合意推奨では, UPC<0.5までの軽減(あるいは50%以上のUPCの軽減)を糸球体疾患の治療成功としている^[34]. そのため, 本章では, UPC<0.5までの軽減を蛋白尿の寛解, そして寛解には至らないまでも50%以上のUPCの軽

減が認められた場合を蛋白尿の部分寛解と判断した。

U-Aldo:C の測定

RAAS 活性化の指標である U-Aldo:C の測定のために、 -30°C にて凍結保存してあった尿検体を検査センター (FUJIFILM Monolith Co., Ltd., Tokyo, Japan) に提出した。なお、尿中アルドステロン濃度は、固相ラジオイムノアッセイ法 (SPAC-S Aldosterone kit, FUJIREBIO INC., Tokyo, Japan) により測定した。

ABT の定義

ABT の定義は、「Post-tel の U-Aldo:C 値がカットオフ値である $1.0\ \mu\text{g/g}$ を越えた場合」とした。なお、このカットオフ値は過去の報告において、健康犬の値に基づいて算出したものである^[35]。ABT が認められた場合、その発生率をパーセンテージで表示した。

統計解析

統計解析は市販のソフトウェアである SPSS Statistics 24.0 (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を使用して実施した。全てのデータの正規性は、Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した。Pre-tel および Post-tel での各項目の比較は、対応のある t 検定および Wilcoxon の符号付順位検定を用いて評価した。なお、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

5.3 結果

症例

10 頭のイヌが本研究に組み込まれた。犬種の内訳として、ヨークシャーテリア ($n = 5$)、パピヨン ($n = 4$) および雑種犬 ($n = 1$) が含まれた。各症例でのテルミサルタンの用量は $1.0\ \text{mg/kg}$ (うち 2 頭では、それぞれ $1.15\ \text{mg/kg}$ および $1.25\ \text{mg/kg}$)、 $q24\ \text{h}$ だった。これらのイヌのうち 6 頭は、Pre-tel で ACE 阻害薬が投与されていた (投与期間の中央値 (最小-最大) : $400(5-1,266)$ 日)。さらに、このうち 3 頭では ACE 阻害薬であるベナゼプリル (用量 : それぞれ 0.82 , 0.76 および $0.53\ \text{mg/kg}$, 全て $q12\ \text{h}$) を継続していた。また、2 頭のイヌでは高血圧の治療として降圧剤 (アムロジピンまたはヒドララジン) が

投与されていた。

テルミサルタン療法前後での臨床および検査データ

全てのイヌにおけるテルミサルタン投与前後での評価項目を表 5-1 に要約した。Pre-tel と比較して、Post-tel に血中カリウム濃度は有意に増加し、UPC は有意に低下していた（それぞれ $P=0.018$ および $P=0.017$ ）。なお、10 頭中 5 頭のイヌで蛋白尿の寛解または部分寛解が認められた（5 頭中 4 頭が寛解、残りの 1 頭が部分寛解）。血中カリウム濃度の増加に関しては、1 頭のみで Post-tel において参考範囲を逸脱していた（5.5 mEq/L；参考範囲 3.8–5.1 mEq/L）。なお、この症例ではテルミサルタンおよびベナゼプリルが併用投与されていた。その他の項目には有意差は認められなかった。

ABT の発生率

Post-tel において、10 頭中 7 頭のイヌで U-Aldo:C が $1.0\mu\text{g/g}$ を越えており、ABT の発生が認められた。つまり、ABT の発生率は 70% だった。なお、ABT の発生が認められなかった 3 頭のイヌのうち 2 頭では、Pre-tel までベナゼプリルが投与されており（投与期間：それぞれ 5 日間および 1,129 日間）、1 頭は Pre-tel 以降も継続していた（用量：0.82 mg/kg, q12h）。また、Pre-tel までベナゼプリルが投与されていた 2 頭に関しては、高血圧に対する降圧剤（アムロジピンまたはヒドララジン）も投与されていた。

表 5-1. テルミサルタン療法前後での各評価項目の比較.

項目	Pre-tel	Post-tel
年齢 (years)		9.1 ± 1.2
雄/雌		5/5
Cre (mg/dL) *a	0.79 (0.69–1.13)	0.76 (0.66–1.23)
Na (mEq/L) *a	148 ± 3	146 ± 2
K (mEq/L) *a	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.5 *1
SBP (mmHg) *b	173 ± 12	153 ± 15
UPC	4.38 (1.26–9.66)	1.60 (0.14–8.71) *2
U-Aldo:C (µg/g)	2.3 ± 0.9	4.1 ± 3.4

データは平均 ± 標準偏差および中央値 (最小–最大) で表示 (n = 10).

Pre-tel, テルミサルタン投与前; Post-tel, テルミサルタン投与後; Cre, クレアチニン;

Na, ナトリウム; K, カリウム; SBP, 収縮期血圧; UPC, 尿蛋白/クレアチニン比;

U-Aldo:C, 尿中アルドステロン・クレアチニン比.

* Pre-tel と比較して $P < 0.05$ (*1 $P = 0.018$, *2 $P = 0.017$).

*a 10 頭中 9 頭で得られたデータ.

*b 10 頭中 6 頭で得られたデータ.

5.4 考察

本章では、ABT の判断基準としてカットオフ値を採用した。症例が既に ACE 阻害薬などの RAAS 抑制療法を受けている場合、ベースライン値と比較した判断できないため、このカットオフ値を用いることが唯一の ABT の判定方法だと思われる⁵⁾。

本章の結果より、RAAS 抑制療法を実施している糸球体疾患のイヌにおいても ABT が発生することがわかった。そして、その発生率は 70%と高かった。10 頭という小さなサンプルサイズでの結果であること、そして異なる研究デザインであることは留意すべきものの、CKD のヒトでの ABT の発生率の報告 (40%および 41%:糖尿病性腎症^[66,67], 53% : IgA 腎症^[33]) と比較して高い結果となった。

ABT の詳細な機序は不明だが、これまでにいくつかの要因が報告されており、ACE 活性の不十分な抑制 (薬剤の用量不足)、RAAS 抑制療法中での高い血中 Ang II 濃度およびカリウム濃度、そしてアルドステロン産生を刺激する因子 (副腎皮質刺激ホルモンなど)などが挙げられる^[13]。本章での各症例でのテルミサルタンの用量は約 1.0 mg/kg, q24h だったが、この用量は RAAS の抑制には不十分だった可能性がある。ACE 阻害薬に関しては、高用量で使用しても RAAS 活性化を抑制する効果がなかったことが薬剤誘発性 RAAS 活性化のモデル犬において報告されている²⁾。そのため、ARB に関しても ABT の発生が用量非依存性であるかは今後の研究が必要とされる。また、高い血中カリウム濃度に関しては、いくつかの研究において ABT と関連性がないことが報告されている^[5,13,66]。本章においても、Post-tel で高カリウム血症が認められた症例が 1 頭いたが、ABT は認められなかった。

テルミサルタン (10 頭中 3 頭のイヌで ACE 阻害薬を併用) の投与により、UPC は有意に低下した。そして、蛋白尿の寛解または部分寛解が認められた 5 頭中 2 頭のイヌで、ACE 阻害薬およびテルミサルタンの併用療法を実施していた。したがって、蛋白尿の治療および RAAS 活性化の抑制を目的とした ACE 阻害薬および ARB の併用療法は効果的だと思われる。ヒトでは、ACE 阻害薬または ARB に MRA を併用した場合、より強い蛋白尿の軽減効果が得られることが報告されている^[21,22]。また、糖尿病性腎症のヒトでは、ACE 阻害薬療法で ABT が認められた後にスピロラク톤を追加投与した場合、血圧に変動は認められなかったが、尿中蛋白排泄量が有意に低下したことが報告されている^[66]。このことは、ACE 阻害薬などによる糸球体高血圧の改善とは別の機序、

つまりアルドステロンの抑制による作用（抗酸化作用，糸球体毛細血管の構造的な改善など）で蛋白尿が軽減したと推測することができる。糸球体疾患のイヌの管理でのMRAの使用に関する報告はないが，ACE阻害薬またはARBによる治療で蛋白尿が軽減しない場合には投与を試みる価値があると思われる。そのためには，糸球体疾患のイヌでのMRAの有効性および有害反応を検討するさらなる研究が期待される。

CKDのヒトでは，ACE阻害薬およびARBの併用療法は蛋白尿の軽減に有効であることが報告されているが，高カリウム血症，低血圧および糸球体濾過量の低下などのリスクがどちらかの単剤療法と比較して高いことが知られている^[26,28]。本章では，テルミサルタン投与後に引き続きACE阻害薬を併用した症例の3頭中2頭で蛋白尿が寛解または部分寛解したが，これらの症例では高カリウム血症は認められなかった。いっぽう，併用療法を実施した残りの1頭では，ABTの発生は認められなかったものの，蛋白尿は部分寛解に至らなかった。そして，この症例ではPost-telにおいて高カリウム血症が認められた。したがって，上述した通り，蛋白尿の治療を目的としたACE阻害薬およびARBの併用療法は効果的だと思われるが，ヒトでの報告と同様，糸球体疾患のイヌでこれらの薬剤の併用療法を実施する場合は，高カリウム血症を含めた有害反応の発生に注意しながら使用する必要があると思われる。そして，MRAをACE阻害薬またはARBと併用する場合も高カリウム血症などの有害反応の有無を定期的にモニタすべきだと考えられる^[21,22,70,73]。

本章にはいくつかの制限がある。第1に，サンプルサイズが小さく，そして回顧的研究であった。そのため，ABTが糸球体疾患の進行（UPCの悪化，糸球体濾過量の低下など）または予後を含めた臨床転帰と関連するかどうかを正確に評価するためには，より大規模な，良好にデザインされた前向き試験が必要とされる。第2に，U-Aldo:Cは検査日に1回採取された尿検体を用いて測定した。アルドステロンの分泌および排泄をより正確に反映した結果を得るには，1日2回のサンプル採取が望ましいと思われる^[9]。最後に，本章ではRAAS活性化の指標としてU-Aldo:Cのみを評価した。ABTの発生要因を正確に判断するためには，血中Ang II濃度，ACE活性およびレニン活性などの様々なRAAS関連因子を評価する必要があると思われる。

5.5 小括

本章では、RAAS 抑制療法を実施している糸球体疾患のイヌにおいて ABT が発生しているかどうかを評価した。

その結果、RAAS 抑制療法としてテルミサルタンを投与していた糸球体疾患のイヌにおいて、ABT の発生が認められた。そして、その発生率は70%だった。したがって、ABT が糸球体疾患のイヌでの臨床転帰に与える影響を評価するための、より大規模で、前向きな臨床試験の実施が正当化される。

第6章

総括

第1章では、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬およびまたはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) を使用したレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) 抑制療法の有用性を述べ、続いて RAAS 抑制療法の開始後に認められるアルドステロン・ブレイクスルー (ABT) の定義、発生率、要因および問題点を要約した。そして、ACE 阻害薬または ARB にミネラルコルチコイド受容体拮抗薬 (MRA) を併用した際の有用性を述べ、イヌで MRA の臓器保護効果を評価することの重要性を指摘した。第2および第3章にて薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を使用し、ACE 阻害薬であるアラセプリル、そして ARB であるテルミサルタンの RAAS 抑制効果を検討した。また、第4章では薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を使用し、アラセプリルと併用した MRA (スピロラクトン, エプレレノン) の臓器保護効果を評価した。最後に第5章では、糸球体疾患のイヌでの ABT の発生の有無について調査した。

第2章：イヌでの薬剤誘発性 RAAS 活性化に対するアラセプリルの抑制効果の検討

イヌでは粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) の発生が多く、その標準療法として ACE 阻害薬が用いられている。ACE 阻害薬であるベナゼプリルおよびエナラプリルを使用した際の RAAS 抑制効果に関しては、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬での報告がある。しかし、アラセプリルでの RAAS 活性化に対する抑制効果は明らかにされていない。そこで本章では、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて、アラセプリルが長期間にわたり RAAS を十分に抑制するかどうかを評価した。

供試動物として、臨床的に健康な雌のビーグル犬 5 頭を用いた。各イヌに低血圧誘発性の RAAS 活性化を生じさせるためにアムロジピン (0.5 mg/kg, q12 h: 8時および20時, PO) を14日間投与し、その翌日からアラセプリル (1.5 mg/kg, q12 h: 8時および20時, PO) を追加投与した。アムロジピン投与前 (-14日目), アムロジピン投与14日後 (ベースライン, BL), そしてアラセプリル併用後の1, 7, 14, 28 および56日目に RAAS 活性化の指標である尿中アルドステロン・クレアチニン比 (U-Aldo:C) を評価した。

その結果、U-Aldo:C はアムロジピン投与後に有意に上昇した ($P = 0.04$)。また、U-Aldo:C は BL と比較して14および28日目に有意に減少したが (それぞれ $P = 0.03$ お

よび $P=0.02$), 56 日目には上昇し, その差は有意でなくなった ($P=0.32$). また, 個体毎に U-Aldo:C の推移を評価した場合, 5 頭中 2 頭のイヌの U-Aldo:C が BL 値を上回っていた.

以上より, アラセプリルは RAAS 活性化の指標である U-Aldo:C を一時的には抑制したが, その効果は持続しなかった. すなわち, その持続期間の問題から臨床的に使用する上では課題があることが明らかになった. この時間経過に伴う RAAS 抑制効果の減弱については, ABT の存在を考慮する必要があると考えられた.

第 3 章 : イヌでの薬剤誘発性 RAAS 活性化に対するテルミサルタンの抑制効果の検討

心不全または糸球体疾患のヒトを対象に行われた ACE 阻害薬および ARB の臨床試験では, これらの薬剤を用いた RAAS 抑制療法の開始後での ABT の発生が報告されている. イヌでの ABT の発生は, 薬剤誘発性 RAAS 活性化モデルおよび MMVD での ACE 阻害薬の投与後に報告がある. しかし, イヌで ARB の投与後に ABT が発生するかは明らかにされていない. そこで本章では, 薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を用いて, ARB であるテルミサルタンが RAAS を抑制するかどうかを評価した.

供試動物には, 臨床的に健康な雌のビーグル犬 5 頭を用いた. 各イヌにアムロジピン (0.5 mg/kg , q12 h: 8 時および 20 時, PO) を 14 日間投与し, その翌日からテルミサルタン (1.0 mg/kg , q24 h: 8 時, PO) を追加し, この併用療法は 84 日間にわたり実施した. アムロジピン投与前 (-14 日目), アムロジピン投与 14 日後 (BL), そしてテルミサルタン併用後の 1, 7, 14, 28, 56 および 84 日目に 24 時間尿中アルドステロン排泄量 (U-Aldo) を評価した.

その結果, U-Aldo はアムロジピン投与後に有意に増加した ($P=0.04$). また, テルミサルタン投与後で U-Aldo の中央値に有意な変化は認められなかった (Friedman 検定にて $P=0.241$). 個体毎に変動を比較すると, 5 頭中 2 頭で ABT の発生が認められた.

以上より, テルミサルタンによる U-Aldo の低下は持続して認められず, そして 5 頭中 2 頭のイヌでは U-Aldo のさらなる増加を抑制しなかった. すなわち, 薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬では, テルミサルタンは RAAS を十分に抑制できず, その要因として ABT の発生が関与していることも明らかとなった. そのため, ヒトと同様, イヌで

ARBを使用する場合はABTの存在を考慮する必要があると思われる。

第4章：イヌでの薬剤誘発性RAAS活性化に対するアラセプリルと併用したMRAの効果の検討

ACE阻害薬投与後のABTは、薬剤誘発性RAAS活性化モデル犬だけでなく、自然発症したMMVDのイヌでも認められている。さらに、第3章で示した通り、ARBであるテルミサルタン投与後のABTの発生が薬剤誘発性RAAS活性化モデル犬で認められることが明らかになった。すなわち、このことはACE阻害薬またはARBの投与だけではRAASの活性化を十分に抑制できないことを示しており、その要因であるABTに関連した臓器障害を防止することが重要になる。そのため、心不全あるいは慢性腎臓病(CKD)のヒトでは、従来の治療薬(ACE阻害薬、ARBなど)にスピロラクトンまたはエプレレノンなどのMRAを併用することがあり、その有益性が報告されている。いっぽう、イヌでは臓器保護薬としてのMRAを評価した研究は極めて少なく、推奨投与量が明確に設定されていないのが現状である。したがって、本章では、薬剤誘発性RAAS活性化モデル犬を用いて、アラセプリルおよびMRA(スピロラクトン、エプレレノン)を併用投与し、MRAによる臓器保護効果が得られるかどうかを評価した。

供試動物には、臨床的に健康な雌のビーグル犬5頭を用いた。本研究は前向きクロスオーバー試験とした。各イヌにアムロジピン(0.5 mg/kg, q12h:8時および20時, PO)を14日間投与し、その翌日からアラセプリル(1.5 mg/kg, q12h:8時および20時, PO)およびMRAを追加し、この併用療法は56日間にわたり実施した。MRAとして、スピロラクトンおよびエプレレノンを投与し、以下に示す4種類の用量で投与した；スピロラクトン(2 mg/kg, q24 h:8時, POまたは2 mg/kg, q12 h:8時および20時, PO)、エプレレノン(5 mg/kg, q24 h:8時, POまたは10 mg/kg, q24 h:8時, PO)。アムロジピン投与前(-14日目)、アムロジピン投与14日後(BL)、そしてアラセプリルおよびMRA併用投与後の1, 7, 14, 28および56日目に組織線維化のバイオマーカーである血清ガレクチン-3(Gal-3)濃度を評価した。

その結果、スピロラクトンq24 h群では、BL値と比較して血清Gal-3濃度は1および28日目で有意に低下した($P=0.041$ および 0.035)。また、スピロラクトンq12

h群では、14および28日目で血清Gal-3濃度は有意に低下した($P=0.001$ および 0.022)。これに対して、エプレレノン 10 mg/kg 群では、血清Gal-3濃度はBL値と比較して1, 7, 14, 28 および56日目で低下傾向が認められたが、有意差はなかった。なお、5 mg/kg 群でも同様に有意差はなかった。

以上より、薬剤誘発性RAAS活性化モデル犬では、スピロラクトン 2 mg/kg, q24 h または q12 h の投与で一時的ではあるが血清Gal-3濃度は有意に低下した。したがって、これらの用量で投与した際のスピロラクトンは臓器保護効果を得る上で有用である可能性がある。これに対して、エプレレノン 5 mg/kg または 10 mg/kg, q24 h の投与では血清Gal-3濃度の有意な低下は認められなかった。そのため、エプレレノンをこれらの用量で使用する場合、十分な臓器保護効果を得られない可能性がある。

第5章：糸球体疾患のイヌにおけるABTの発生に関する検討

糸球体疾患はCKDの1つであり、そして著しい持続的な蛋白尿を引き起こすことが重要な特徴である。糸球体疾患のイヌに対する標準療法の1つとして、ACE阻害薬およびまたはARBなどを使用したRAAS抑制療法がある。CKD（糖尿病性腎症またはIgA腎症）のヒトでは、RAAS抑制療法の開始後にABTが発生し、疾患の悪化と関連することが報告されている。いっぽう、CKDのイヌでのABT発生に関する調査はされていない。そこで本章では、テルミサルタン療法を実施している糸球体疾患のイヌにおいてABTが発生するかどうかを評価した。

本章では、日本獣医生命科学大学附属動物医療センター腎臓科に来院し、糸球体疾患と診断したイヌのカルテを回顧的に再調査した。糸球体疾患の診断基準は、膀胱穿刺法またはカテーテル法で採取した尿を用いて尿蛋白/クレアチニン比を測定し、その値が1.0以上とした。なお、本章でのABTの定義は、「テルミサルタン投与後のU-Aldo:C値がカットオフ値である $1.0 \mu\text{g/g}$ を越えた場合」とした。

その結果、10頭のイヌが本研究に組み込まれた。犬種の内訳は、ヨークシャーテリア ($n=5$)、パピヨン ($n=4$) および雑種犬 ($n=1$) だった。テルミサルタン投与後において、10頭中7頭のイヌでU-Aldo:Cが $1.0 \mu\text{g/g}$ を越えており、ABTの発生が認められた。つまり、ABTの発生率は70%だった。

以上より、RAAS 抑制療法としてテルミサルタンを投与していた糸球体疾患のイヌにおいて、ABT の発生が認められた。したがって、ABT が糸球体疾患のイヌでの臨床転帰に与える影響を評価するための、より大規模で、前向きな臨床試験の実施が正当化される。

本研究の結論と今後の展望

本研究により、薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬では、ACE 阻害薬または ARB の投与では RAAS の活性化を十分に抑制できない個体が存在することが解った。この要因として、ABT の関連性が明らかとなった。また、糸球体疾患のイヌでは、ヒトと同様、ABT が発生することも判明した。

ABT は疾患および予後の悪化と関連することがヒトでは多く報告されている。そのため、イヌでも ABT が疾患の進行または予後を含めた臨床転帰と関連するかどうかを正確に評価するための、より大規模な良好にデザインされた前向き試験が必要だと思われる。加えて、臨床現場では ABT が発生していない個体および発生している個体を鑑別するための検査がないことも今後の大きな課題である。

また、本研究は薬剤誘発性 RAAS 活性化モデル犬を使用し、MRA の臓器保護効果を血清 Gal-3 濃度により評価した。スピロラクトン (2 mg/kg, q24 h または q12 h) が臓器保護効果を得る上で有用である可能性があり、エプレレノン (5 mg/kg または 10 mg/kg, q24 h) では十分な効果は得られない可能性があることが解った。こうした結果は、MRA のミネラルコルチコイド受容体への選択性および親和性などの薬理学的な特徴の違いに起因していたと思われる。しかし、本研究では心臓および腎臓での組織および機能障害を評価していない。そのため、MRA による血清 Gal-3 濃度の低下がこうした機能障害の改善と関連したかどうかは不明である。そのため、これらの点を評価することで、MMVD または CKD のイヌでの MRA の臓器保護薬としての有益性が明らかになることを期待したい。

参考文献

1. Acierno MJ, Brown S, Coleman AE, Jepson RE, Papich M, Stepien RL, Syme HM. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2018;32:1803–1822.
2. Ames MK, Atkins CE, Lee S, Lantis AC, zumBrunnen JR. The effect of high dose enalapril and benazepril on the pharmacologically-activated renin-angiotensin-aldosterone system in the normal dog. *Am J Vet Res* 2015;76:1041–1050.
3. Ames MK, Atkins CE, Webb K. The urine aldosterone to creatinine ratio (UALDO:C) determined by radioimmunoassay (RIA) in normal dogs greater than 5 years of age. *J Vet Intern Med* 2015;29:1148 (abstract).
4. Ames MK, Atkins CE, Lantis AC, Zum Brunnen J. Evaluation of subacute change in RAAS activity (as indicated by urinary aldosterone:creatinine, after pharmacologic provocation) and the response to ACE inhibition. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2016;17:1–12.
5. Ames MK, Atkins CE, Eriksson A, Hess AM. Aldosterone breakthrough in dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease. *J Vet Cardiol* 2017;19:218–227.
6. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med* 2019;33:363–382.
7. Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation* 1997;96:526–534.
8. Arai K, Homma T, Morikawa Y, Ubukata N, Tsuruoka H, Aoki K, Ishikawa H, Mizuno M, Sada T. Pharmacological profile of CS-3150, a novel, highly potent and selective non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2015;761:226–234.
9. Atkins CE, Lantis AC, Ames MK, Gardner SY. Utility of urinary aldosterone measurement in quantitating RAAS activation. *J Vet Pharmacol Ther*

2012;35:512–515.

10. Bakris G, Burgess E, Weir M, Davidai G, Koval S; AMADEO Study Investigators. Telmisartan is more effective than losartan in reducing proteinuria in patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008;74:364–369.
11. Beenken A, Bomback AS. Aldosterone breakthrough dose not alter central hemodynamics. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2017;18:1470320317735002. doi: 10.1177/1470320317735002.
12. Bernay F, Bland JM, Häggström J, Baduel L, Combes B, Lopez A, Kaltsatos V. Efficacy of spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2010;24:331–341.
13. Bomback AS, Klemmer PJ. The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007;3:486–492.
14. Bomback AS, Rekhtman Y, Klemmer PJ, Canetta PA, Radhakrishnan J, Appel GB. Aldosterone breakthrough during aliskiren, valsartan, and combination (aliskiren + valsartan) therapy. *J Am Soc Hypertens* 2012;6:338–345.
15. Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res* 2013;50:89–99.
16. Bugbee AC, Coleman AE, Wang A, Woolock AD, Brown SA. Telmisartan treatment of refractory proteinuria in a dog. *J Vet Intern Med* 2014;28:1871–1874.
17. Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P, López-Andrés N. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:67–75.
18. Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, Cachofeiro V, Rousseau E, Sádaba JR, Zannad F, Rossignol P, López-Andrés. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries. *JACC Heart Fail* 2015;3:59–67.
19. Ciccoira M, Zanolla L, Franceschini L, Rossi A, Golia G, Zeni P, Caruso B, Zardini P. Relation of aldosterone "escape" despite angiotensin-converting enzyme inhibitor administration to impaired exercise capacity in chronic congestive heart

- failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cradiol* 2002;89:403–407.
20. Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, Golia G, Franceschini L, Brighetti G, Marino P, Zardini P. Long-term, dose-dependent effects of spironolactone on left ventricular function and exercise tolerance in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:304–310.
 21. Currie G, Taylor AH, Fujita T, Ohtsu H, Lindhardt M, Rossing P, Boesby L, Edwards NC, Ferro CJ, Townend JN, van den Meiracker AH, Saklayen MG, Oveisi S, Jardine AG, Delles C, Preiss DJ, Mark PB. Effect of mineralocorticoid receptor antagonists on proteinuria and progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol* 2016;17:127. doi: 10.1186/s12882-016-0337-0.
 22. Dhaybi OA, Bakris G. Mineralocorticoid antagonists in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2017;26:50–55.
 23. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* 2018;41:599–614.
 24. Epstein M, Williams GH, Weinberger M, Lewin A, Krause S, Mukherjee R, Patni R, Beckerman B. Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:940–951.
 25. Ettinger SJ, Benitz AM, Ericsson GF, Cifelli S, Jernigan AD, Longhofer SL, Trimboli W, Hanson PD, for the Long-Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213:1573–1577.
 26. Feng Y, Huang R, Kavanagh J, Li L, Zeng X, Li Y, Fu P. Efficacy and safety of dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic kidney disease: a meta-analysis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2019;19:259–286.

27. Güder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Allolio B, Ertl G, Angermann CE, Störk S. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation* 2007;115:1754–1761.
28. Hakani H, Bangalore S, Desouza KA, Shah A, Messerli FH. Efficacy and safety of dual blockade of the renin-angiotensin system: meta-analysis of randomized trials. *BMJ* 2013;346:f360. doi: 10.1136/bmj.f360.
29. Hano T, Mohara O, Nakamura N, Nishio I, Masuyama Y. Norepinephrine release inhibitory effect from the peripheral sympathetic nerve ending by angiotensin converting enzyme inhibitor. Comparison of desacetylalacepril and captopril. *Jpn J Clin Pharmacol Ther* 1992;23:143–144.
30. Hezzell MJ, Boswood A, Chang YM, Moonarmart W, Elliott J. Associations among serum N-terminal procollagen type III concentration, urinary aldosterone-to-creatinine ratio, and ventricular remodeling in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res* 2012;73:1765–1774.
31. Hezzell MJ, Boswood A, López-Alvarez J, Lötter N, Elliott J. Treatment of dogs with compensated myxomatous mitral valve disease with spironolactone- a pilot study. *J Vet Cardiol* 2017;19:325–338.
32. Hori Y, Nakamura K, Kanno N, Hitomi M, Yamashita Y, Hosaka S, Isayama N, Mimura T. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor alacepril in dogs with mitral valve disease. *J Vet Med Sci* 2018;80:1212–1218.
33. Horita Y, Taura K, Taguchi T, Furusu A, Kohno S. Aldosterone breakthrough during therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers in proteinuric patients with immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2006;11:462–466.
34. IRIS Canine GN Study Group Standard Therapy Subgroup, Brown S, Elliott J, Francey T, Polzin D, Vaden S. Consensus recommendations for standard therapy of glomerular disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2013;27:S27–S43.
35. Ishikawa T, Tanaka R, Suzuki S, Miyaishi Y, Akagi H, Iino Y, Fukushima R, Yamane Y. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors of left atrial

- pressure in dogs with mitral valve regurgitation. *J Vet Intern Med* 2010;24:342–347.
36. Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, Kirk CA, Allen TA, Swanson LL. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc* 2005;226:393–400.
 37. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, Kopp A, Austin PC, Laupacis A, Redelmeier DA. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med* 2004;351:543–551.
 38. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:452–458.
 39. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggström J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R, Uechi M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2019;33:1127–1140.
 40. Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, Shimizu M, Nishiyama A, Kawachi H, Kagami S. Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Transl Res* 2011;158:235–248.
 41. Kinugawa T, Kato M, Mori M, Endo A, Kato T, Hamada T, Noguchi N, Omodani H, Osaki S, Ogino K, Miyakoda H, Hisatome I, Shigemasa C. Effects of a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, alacepril, on changes in neurohormonal factors and arterial baroreflex sensitivity in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54:209–214.
 42. Konta M, Nakagawa M, Sakatani A, Akabane R, Miyagawa Y, Takemura N. Evaluation of the inhibitory effects of telmisartan on drug-induced renin-angiotensin-aldosterone system activation in normal dogs. *J Vet Cardiol* 2018;20:376–383.

43. Krum H, Shi H, Pitt B, McMurray J, Swedberg K, van Veldhuisen DJ, Vincent J, Pocock S, Zannad F, for the EMPHASIS-HF Study Group. Clinical benefit of eplerenone in patients with mild symptoms of systolic heart failure already receiving optimal best practice background drug therapy analysis of the EMPHASIS-HF Study. *Circ Heart Fail* 2013;6:711–718.
44. Lantis AC, Ames MK, Atkins CE, DeFrancesco TC, Keene BW, Werre SR. Aldosterone breakthrough with benazepril in furosemide-activated renin-angiotensin-aldosterone system in normal dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2014;38:65–73.
45. Lantis AC, Ames MK, Werre S, Atkins CE. The effect of enalapril on furosemide-activated renin-angiotensin-aldosterone system in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2015;38:513–517.
46. Lefebvre HP, Ollivier E, Atkins CE, Combes B, Concordet D, Kaltsatos V, Baduel L. Safety of spironolactone in dogs with chronic heart failure because of degenerative valvular disease: a population-based, longitudinal study. *J Vet Intern Med* 2013;27:1083–1091.
47. Levin S, McMahon E, John-Baptiste A, Bell RR. Prostate effect in dogs with the aldosterone receptor blocker eplerenone. *Toxicol Pathol* 2013;41:271–279.
48. Lin YH, Chou CH, Wu XM, Chang YY, Hung CS, Chen YH, Tzeng YL, Wu VC, Ho YL, Hsieh FJ, Wu KD; TAIPAI Study Group. Aldosterone induced galectin-3 secretion in vitro and in vivo: from cells to humans. *PLoS One* 2014;9:e95254. doi:10.1371/journal.pone.0095254
49. Macdougall DF, Cook T, Steward AP, Cattell V. Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney Int* 1986;29:1144–1151.
50. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaithiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsärinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S; ONTARGET investigators. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both,

in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 2008;372:547–553.

51. Mihailidou AS, Loan Le TY, Mardini M, Funder JW. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension* 2009;54:1306–1312.
52. Mii A, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Kawachi H, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y. Angiotensin II receptor blockade inhibits acute glomerular injuries with the alteration of receptor expression. *Lab Invest* 2009;89:164–177.
53. Minato H, Hosoki K, Hayashi K, Sawayama T, Kadokawa T, Hashimoto M. Antihypertensive mechanism of alacepril. Effects of its metabolites on the peripheral sympathetic nervous system. *Arzneimittelforschung* 1989;39:319–324.
54. Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther* 2006;112:668–676.
55. Osterziel KJ, Dietz R, Schmid W, Mikulaschek K, Manthey J, Kübler W. ACE inhibition improves vagal reactivity in patients with heart failure. *Am Heart J* 1990;120:1120–1129.
56. Parviz Y, Iqbal J, Pitt B, Adlam D, Al-Mohammad A, Zannad F. Emerging cardiovascular indications of mineralocorticoid receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:201–211.
57. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J, for the Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999;341:709–717.
58. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, for the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309–1321.

59. Plumb DC. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. N.J.:Wiley; 2015. p. 1001–1002.
60. Rastogi S, Mishra S, Zacà V, Alesh I, Gupta RC, Goldstein S, Sabbah HN. Effect of long-term monotherapy with the aldosterone receptor blocker eplerenone on cytoskeletal proteins and matrix metalloproteinases in dogs with heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:415–422.
61. Re RN. A mechanism for mineralocorticoid participation in renal disease and heart failure. *J Am Soc Hypertens* 2015;9:586–591.
62. Rossing K, Schjoedt KJ, Smidt UM, Boomsma F, Parving HH. Beneficial effects of adding spironolactone to recommended antihypertensive treatment in diabetic nephropathy: a randomized, double-masked, cross-over study. *Diabetes Care* 2005;28:2106–2112.
63. Sakarin S, Rungsipipat A, Surachetpong SD. Galectin-3 in cardiac muscle and circulation of dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Cardiol* 2016;18:34–46.
64. Sakatani A, Miyagawa Y, Takemura N. Evaluation of the effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alacepril, on drug-induced renin-angiotensin-aldosterone system activation in normal dogs. *J Vet Cardiol* 2016;18:248–254.
65. Sato A, Saruta T. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Int Med Res* 2001;9:3–21.
66. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003;41:64–68.
67. Schjoedt KJ, Andersen S, Rossing P, Tarnow L, Parving HH. Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. *Diabetologia* 2004;47:1936–1939.
68. Scribner AW, Loscalzo J, Napoli C. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress. *Eur J Pharmacol* 2003;482:95–99.

69. Sent U, Gössl R, Elliott J, Syme HM, Zimmering T. Comparison of efficacy of long-term oral treatment with telmisartan and benazepril in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2015;29:1479–1487.
70. Shah KB, Rao K, Sawyer R, Gottlieb SS. The adequacy of laboratory monitoring in patients treated with spironolactone for congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:845–849.
71. Shibata H, Itoh H. Mineralocorticoid receptor-associated hypertension and its organ damage: clinical relevance for resistant hypertension. *Am J Hypertens* 2012;25:514–523.
72. Stowasser M, Ahmed AH, Pimenta E, Taylor PJ, Gordon RD. Factors affecting the aldosterone/renin ratio. *Horm Metab Res* 2012;44:170–176.
73. Sun LJ, Sun YN, Shan JP, Jiang GR. Effects of mineralocorticoid receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig* 2017;8:609–618.
74. Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, Rudolph AE, McMahan EG, Goldstein S, Sabbah HN. Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation* 2002;106:2967–2972.
75. Takata Y, Arai T, Suzuki S, Kurihara J, Uezono T, Okubo Y, Kato H. Captopril enhances cardiac vagal but not sympathetic neurotransmission in pithed rats. *J Pharmacol Sci* 2004;95:390–393.
76. Tanaka-Esposito C, Varahan S, Jeyaraj D, Lu Y, Stambler BS. Eplerenone-mediated regression of electrical activation delays and myocardial fibrosis in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014;25:556–577.
77. Tang WH, Vagelos RH, Yee YG, Benedict CR, Willson K, Liss CL, Fowler MB. Neurohormonal and clinical responses to high- versus low-dose enalapril therapy in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:70–78.
78. The BENCH Study Group. The effect of benazepril on survival times and clinical

- signs of dogs with congestive heart failure: Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, long-term clinical trial. *J Vet Cardiol* 1999;1:7–18.
79. The COVE Study Group. Controlled clinical evaluation of enalapril in dogs with heart failure: results of the Cooperative Veterinary Enalapril Study Group. *J Vet Intern Med* 1995;9:243–252.
80. The IMPROVE Study Group. Acute and short-term hemodynamic, echocardiographic, and clinical effects of enalapril maleate in dogs with naturally acquired heart failure: results of the Invasive Multicenter PROspective Veterinary Evaluation of Enalapril study. *J Vet Intern Med* 1995;9:234–242.
81. van de Wal RM, Plokker HW, Lok DJ, Boomsma F, van der Horst FA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Voors AA. Determinants of increased angiotensin II levels in severe chronic heart failure patients despite ACE inhibition. *Int J Cardio* 2006;106:367–372.
82. Waanders F, de Vries LV, van Goor H, Hillebrands JL, Laverman GD, Bakker SJ, Navis G. Aldosterone, from (patho)physiology to treatment in cardiovascular and renal damage. *Curr Vasc Pharmacol* 2011;9:594–605.
83. Waddell LS. Systemic Hypotention. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. St. Louis: Saunders; 2017. p. 671–75.
84. Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Vet Rec* 2008;162:141–147.
85. Wu CK, Su MY, Lee JK, Chiang FT, Hwang JJ, Lin JL, Chen JJ, Liu FT, Tsai CT. Galectin-3 level and the severity of cardiac diastolic dysfunction using cellular and animal models and clinical indices. *Sci Rep* 2015;5:17007
86. Xu HZ, Wang WN, Zhang YY, Cheng YL, Xu ZG. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on 12-lipoxygenase activity and slit diaphragm protein expression in type 2 diabetic rat glomeruli. *J Nephrol* 2016;29:775–782.
87. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H,

- Vincent J, Pocock SJ, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011;364:11–21.
88. Zhao J, Li J, Li W, Li Y, Shan H, Gong Y, Yang B. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol* 2010;159:1584–1594.

謝 辞

本論文を終えるにあたり、終始多大なるご指導・ご鞭撻を賜り、そして獣医学の醍醐味を教えていただいた日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室第二の竹村直行教授に甚大なる謝意を表します。

本研究における解析結果に関して多大なるご助言を賜り、さらに研究の意義について熱意をもってご指導していただいた日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室第二の宮川優一講師に心から感謝いたします。

本研究の実施に際して、多くのご協力をいただいた日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室第二の大学院生である赤羽根僚太先生、小川実月先生、長川雅佳先生、宮川寛済先生、ならびに同研究室の卒業生である明石唯也先生、阿部 麗先生、上月遥香先生、椎木夏子先生、石関花衣先生、酒井雄介先生、七條紗季先生、谷 康平先生、寺門秀明先生、中西隼一先生、目澤咲綾先生、河原 咲先生、今田 舞先生、進藤凧沙先生、高谷 渉先生、中澤可奈先生、中村文香先生、中村理紗先生、鍋島健太郎先生、一箭紗和子先生、島野翔太郎先生、原田このみ先生、矢野健人先生、渡邊 陸先生、そして同研究室の室員である石坂美緒さん、加藤安美さん、川村彩乃さん、後藤絵里さん、後藤智紗子さん、澤崎まゆりさん、塩住友哉さん、長谷由貴さん、上野詩音さん、大木 遥さん、山脇日向さん、吉田将汰さん、大垣晴愛さん、大森美穂さん、嘉生紗蘭ファティムさん、小島有希さん、高澤歩美さん、青山祐子さん、片桐啓輔さん、櫻林空良さん、重信あみさん、野原はづきさん、長谷川由比さん、畠山真悠子さん、平田和樹さんに厚く御礼申し上げます。また、本論文を執筆するにあたり、様々なご助言ならびに精神的に支えてくださった同研究室の大学院特別研究生である戸田典子先生、そして同研究室の研究生である坪松若奈先生、増永 朗先生、徳力 剛先生に心から感謝いたします。

本研究を行うに際して、大学院進学を理解し、経済的かつ精神的に支えていただいた父理加、母恵子、そして兄駿一に心から感謝いたします。

最後に、本研究の供試動物、そして本研究にご協力を頂いた腎臓病を患った動物たちに深く感謝するとともに、将来、こうした研究成果によって少しでも多くの動物たちの命が救われることを切に願います。