

# 犬および猫の腎不全におけるシクロオキシゲナーゼ-2およびNO合成酵素-1の発現

誌名	鹿児島大学農学部学術報告
ISSN	04530845
著者名	矢吹,映 遠藤,泰之 藤木,誠 三好,宣彰 松元,光春 鈴木,秀作
発行元	鹿児島大学農学部
巻/号	57号
掲載ページ	p. 21-28
発行年月	2007年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 犬および猫の腎不全におけるシクロオキシゲナーゼ-2 および NO合成酵素-1の発現

矢吹 映<sup>1)\*</sup>・遠藤泰之<sup>2)</sup>・藤木 誠<sup>3)</sup>・三好宣彰<sup>4)</sup>・松元光春<sup>1)</sup>・鈴木秀作<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>基礎獣医学講座解剖学分野, <sup>2)</sup>臨床獣医学講座内科学分野,  
<sup>3)</sup>臨床獣医学講座外科学分野, <sup>4)</sup>病態予防獣医学講座病理学分野)

平成18年6月21日 受理

### 要 約

本研究では、犬および猫の腎不全の進行にシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) およびNO合成酵素-1 (NOS-1) の発現が関与するかを明らかにすることを目的として、病理解剖に供された犬8頭、猫6頭の腎臓を病理組織学的および免疫組織化学的に検索した。腎臓の病態およびCOX-2, NOS-1の発現は定量して統計学的に評価した。検索の結果、犬では、COX-2陽性細胞数と腎線維化進行のマーカーである $\alpha$ -平滑筋アクチン (SMA) の発現スコアとの間に高い相関が認められた。猫では、犬とは異なり、NOS-1陽性細胞数と $\alpha$ -SMAの発現スコアとの間に高い相関が認められた。以上の結果から、犬と猫では腎不全の病態進行メカニズムが異なることが示唆された。

キーワード：犬, 猫, 腎不全, COX-2, NOS-1

### 緒 言

近年、腎疾患進行の共通メカニズムとして、糸球体過剰濾過説 (glomerular hyperfiltration theory) が支持されている。これは、Brenner他[2, 3]により提唱されたもので、一部の糸球体が硬化してその機能が低下すると、残りの糸球体に代償的に負荷がかかって濾過過剰を引き起こし、これによりさらに残存していた健全な糸球体も硬化に陥る、というものである。糸球体過剰濾過の要因としてはレニン・アンジオテンシン (RA) 系の活性化を伴う糸球体内高血圧がよく知られており、すでに人医領域ではRA系阻害薬である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受容体拮抗薬が腎保護薬として治療に汎用されている。さらに、最近ではRA系以外の要因として尿細管糸球体フィードバック (tubuloglomerular feedback; TGF) の減弱が示唆されている。TGFは濾液 (原尿) 中のCl<sup>-</sup>濃度が上昇しても糸球体濾過率 (GFR) を一定に保つ機構

であるが、これにはPGE<sub>2</sub>を産生するシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) とNOを産生するNO合成酵素-1 (NOS-1) の2種の酵素が関与している。すなわち、健全な腎臓では遠位尿細管の緻密斑でCl<sup>-</sup>の上昇を感知すると、COX-2とNOS-1の発現が低下してPGE<sub>2</sub>とNO産生が減少し、血管拡張作用をもつこれらの物質の減少により輸入糸球体細動脈が収縮して糸球体内血圧が下がりGFRは低下する。したがって、COX-2とNOS-1が過剰発現するとTGFが抑制され、これにより糸球体過剰濾過が誘発されると考えられる。すでに、実験動物では1および2型糖尿病モデルラットの腎臓においてCOX-2とNOS-1が過剰発現し、これが糖尿病性腎症での糸球体過剰濾過の一因になると示唆されている[17, 22, 23]。

腎疾患は獣医学領域においても重大な問題であり、特に、小動物臨床では犬および猫の高齢化に伴い慢性腎不全が増加の一途を辿っている。腎疾患進行における糸球体過剰濾過説は犬および猫の慢性腎不全

\* : 連絡責任者: 矢吹 映 (鹿児島大学農学部獣医学科 基礎獣医学講座解剖学分野)

でも支持されている[5, 10]。糸球体過剰濾過の要因については、犬と猫でもRA系の関与が示唆されており、すでに、ACE阻害薬によるRA系の抑制が腎疾患の遅延に効果的であることも証明されている[4, 11]。しかしながら、TGFについては検索が行われておらず、犬および猫では、TGFの調節を司るCOX-2とNOS-1の発現と腎疾患との関連性は明らかでない。そこで本研究では、病理解剖された犬および猫の腎臓を病理組織学および免疫組織化学的に検索し、腎疾患の進行度とCOX-2およびNOS-1の発現動態との関連性を解析した。

## 材料および方法

### 1. 供試材料および標本作製

鹿児島大学農学部附属動物病院において、病理解剖に供された犬8頭および猫6頭の腎臓を使用した。採取した腎臓は、約5mm厚(約1×1cm角)にスライスした後、ザンボニ固定液に浸漬した。1日間(4℃)固定した後0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄し(4℃)、常法に従いパラフィン包埋した。3μm厚の切片を作製し、病理組織学的観察のためには、過ヨウ素酸シッフ(PAS)、マッソントリクロム(MT)および過ヨウ素酸メセナミン銀(PAM)染色を施した。免疫組織化学的検出は、COX-2とNOS-1に加え、腎線維化の活動性マーカーであるα-平滑筋アクチン(SMA)について行った[8]。

### 2. 免疫組織化学的手法

免疫組織化学はElite ABCキット(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を使用して行った。一次抗体には、抗COX-2兎ポリクローナル抗体(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)、抗-NOS-1兎ポリクローナル抗体(Cayman)および抗α-SMA兎ポリクローナル抗体(NeoMarkers, Fremont, CA, USA)を、二次抗体にはビオチン化抗兎IgG山羊血清(Vector)を使用した。一次抗体は各々0.6, 0.3および2μg/ml、二次抗体は7.5μg/mlの濃度で使用した。抗体およびABC液の希釈には0.25%カゼイン/PBSを使用した。

検出は以下の手順で行った。1) 脱パラフィン、2) 再水和、3) 10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中のマイクロウェーブ熱処理による抗原賦活化(予加熱5分、マイクロウェーブ処理10分、室温放置20分)、4) COX-2検出のみ、0.3% Triton X-100/PBSによ

る抗原賦活化(30分振盪)、5) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による内因性ペルオキシダーゼの不活化(30分)、6) PBS浸透(5分×3回)、7) 0.25%カゼイン/PBSによるブロッキング(60分)、8) 一次抗体の反応(4℃、一晚)、9) PBSで洗浄(5分×3回)、10) 二次抗体の反応(30分)、11) PBSで洗浄(5分×3回)、12) ABC液の反応(30分)、13) PBSで洗浄(5分×3回)、14) 0.025% (W/V) 3,3'-diaminobenzidine-0.003% (W/V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による発色、15) 冷却蒸留水による反応停止、14) マイヤーのヘマトキシリンで核染色。陰性コントロール切片には、非免疫化兎IgG(Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)を一次抗体の代わりに反応させた。

### 3. 計測学的手法

- 1) 腎小体の直径: PAS染色標本を使用し、各切片上から血管極および尿細管極が認められる腎小体を約10個選抜した。血管極と尿細管極を結ぶ線を縦軸と仮定し、その横軸の糸球体包外壁から外壁までの最大幅をマイクロメータを用いて計測した。
- 2) 糸球体の硬化スコア: MT染色標本を使用し、過去の方法に基づいて計測を行った[20]。1個体当たり約50個の糸球体を観察し、メサンギウム基質の増殖、メサンギウム細胞の増殖、基底膜病変などにより毛細血管腔が圧迫あるいは消失した硬化領域を基に、a: 正常な糸球体数(係数0)、b: 硬化部が25%未満の糸球体数(係数1)、c: 硬化部が25~50%未満の糸球体数(係数2)、d: 硬化部が50~75%未満の糸球体数(係数3)およびe: 病変部が75%以上の糸球体数(係数4)を計測した。そして  $\{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / (a + b + c + d + e)\} \times 100$  の数式によりスコアを算出した。
- 3) 間質の線維化スコア: MT染色標本を使用した。各個体につき200倍の重複しない領域を約15箇所観察し、各領域を間質の線維化の程度により0(normal)から+4(severe)のグレードに分けた。線維化値は上記と同じ式により算出した。
- 4) 間質への細胞浸潤スコア: PAS染色標本を使用した。上記同様、200倍の視野で0から+4にグレード分けし、数式によりスコアを算出した。
- 5) α-SMA発現スコア: 上記同様、200倍の視野で0から+4にグレードに分けし、数式によりスコアを算出した。
- 6) COX-2発現スコア: 400倍の重複しない領域を約20箇所観察し、陽性細胞数を糸球体(個/糸球

体), 尿細管 (個/領域) および間質 (個/領域) に分けて計測した。

7) NOS-1発現スコア: COX-2と同様の方法で計測を行った。

4. 統計処理

統計処理は統計ソフトJMP Ver. 5.1を使用して行い, 各パラメータ間の相関係数および有意確率を求めた。

結 果

1. 供試動物のプロフィール

本研究に供された犬および猫の性別, 年齢および血液検査値をTable 1にまとめた。年齢は, 犬では8~20才, 猫では1才以下~17才の年齢の幅であり, 腎機能の指標である血中の尿素窒素 (BUN) とクレアチニンの濃度は, 犬, 猫ともに正常範囲内から測定限界を超えた高値まで広範囲に渡っていた。

2. 病理組織学的観察

糸球体では, 程度の差はあるが, 犬, 猫を問わずほとんどの症例でメサングウム基質の増殖と糸球体基底膜の肥厚が観察された。その他には, No. 1~5の犬で糸球体毛細血管内皮の増殖が, No. 1および5の犬, No. 9の猫ではメサングウム細胞の増殖が, No. 9および12の猫では糸球体にスパイクや虫食い像の形成も観察された。No. 5の犬およびNo. 9の猫では糸球体の虚脱も顕著であった。尿細管間質で

は, 程度の差はあるが, 犬, 猫を問わずほとんどの症例で間質への単核細胞浸潤, 結合組織の増生および尿細管の萎縮が観察された。浸潤した細胞のほとんどはリンパ球あるいは形質細胞であった。また, No. 3と4の犬では尿細管上皮に色素沈着が, No. 5の犬とNo. 9の猫では尿円柱が高度であった。Fig. 1には, BUN>200mg/dl, クレアチニン8.4mg/dlと血液学的に末期腎不全と診断されたNo. 9の猫の組織像を示しており, 糸球体および尿細管間質の病変が重度であることがわかる。

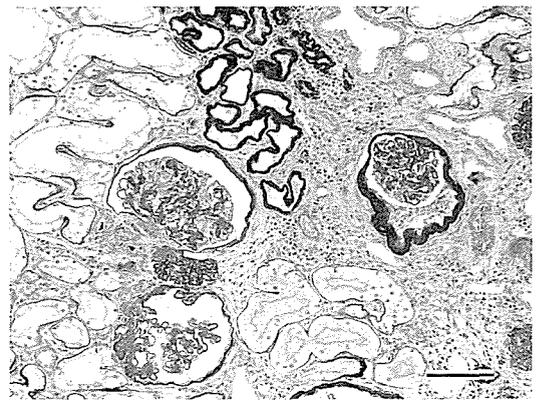


Fig. 1. Light micrograph of kidneys from No. 9 cat. Glomerular and tubulointerstitial damages are very severe. PAS stain. Bar: 100µm.

3. 免疫組織化学的観察

α-SMAの陽性反応は, 程度の差はあるが, 犬, 猫を問わず主として間質の細胞に認められた。腎小

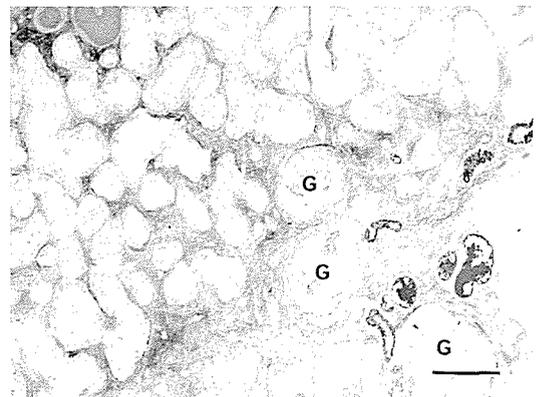


Fig. 2. Immunohistochemical detection of α-SMA in the kidney from No. 9 cat. Positive-signals are observed not only in the blood vessels but also in the peri-tubular and peri-glomerular interstitium. G: glomeruli. Bar: 100µm.

Table 1. Profiles and blood chemicals of animals.

No.	Species	<sup>1</sup> Sex	<sup>2</sup> Age	<sup>3</sup> BUN	<sup>3</sup> Cr
1	Dog	M	13	174	3.3
2	Dog	SF	8	47	3.8
3	Dog	F	10	68	NE
4	Dog	F	10	75	NE
5	Dog	M	20	132	3.1
6	Dog	F	18	16	0.3
7	Dog	F	Uk	15	0.3
8	Dog	M	15	>200	4.8
9	Cat	CM	10	>200	8.7
10	Cat	M	Uk	77	1.6
11	Cat	CM	8	16	0.8
12	Cat	F	2	25	NE
13	Cat	SF	17	84	1.2
14	Cat	F	<1	17	0.7

<sup>1</sup>M: male, F: female, CM: castrated male, SF: spayed female. <sup>2</sup>year. <sup>3</sup>mg/dl. Uk: unknown. NE: not examined.

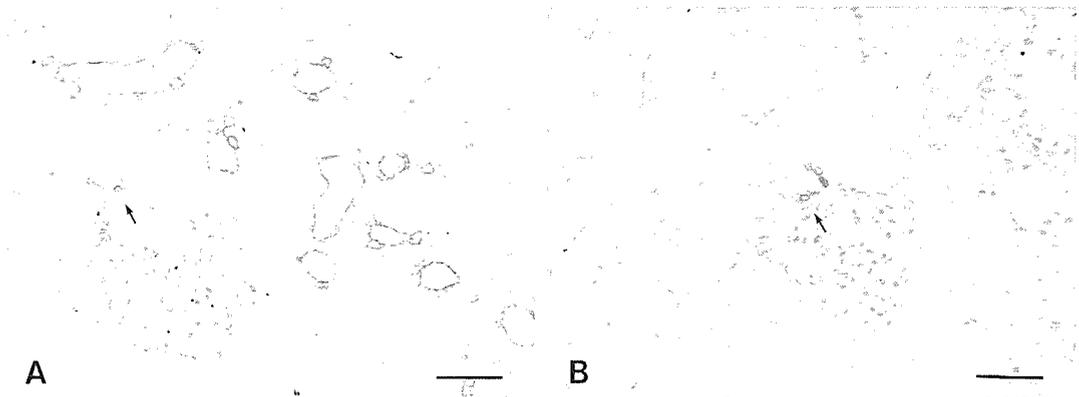


Fig. 3. Immunohistochemical detection of COX-2 in the kidneys from No. 6 Dog (A) and No. 14 cat (B). In the dog kidney, positive-signals are observed not only in the macula densa cells but also in many cells of the distal tubules (A). In contrary, positive-signals in the cat kidney are limited to the macula densa regions (B). Arrows indicate macula densa cells. Bars: 50µm

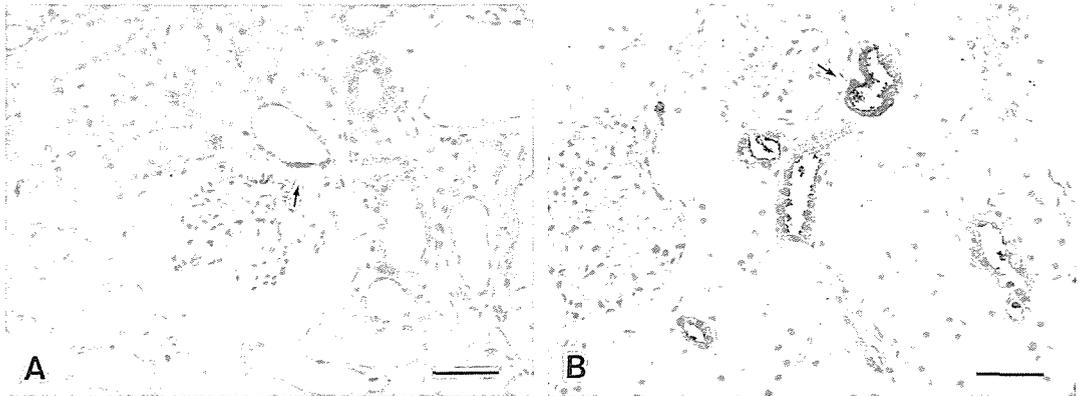


Fig. 4. Immunohistochemical detection of NOS-1 in the kidneys. (A) No. 5 Dog. (B) No. 11 cat. In the dog kidney, positive-signals are limited to the macula densa regions (A). In contrary, positive-signals in the cat kidney are not only in the macula densa cells but also in many cells of the distal tubules (B). Arrows indicate macula densa cells. Bars: 50µm.

体では、糸球体包（ボウマン嚢）外壁には多くの症例で陽性反応が観察されたが、糸球体には陽性反応はみられなかった（Fig. 2）。

COX-2の陽性反応は、犬、猫を問わず、主として遠位尿細管の緻密斑に観察されたが、緻密斑でも陰性のものも多く、緻密斑以外の遠位尿細管や集合管上皮にも陽性反応は観察された。また、間質の細胞や糸球体でも少数ながら陽性細胞が観察された。犬と猫を比較すると、犬の方がCOX-2陽性細胞は多く観察された（Fig. 3, Table 2）。

NOS-1の陽性反応もCOX-2と同様、犬、猫を問わず、主として遠位尿細管の緻密斑に観察され、また、緻密斑以外の遠位尿細管や集合管上皮にも陽性反応は観察された。一方、間質や糸球体には陽性反

応は観察されなかった。犬と猫を比較すると、COX-2とは異なり、猫の方がCOX-2陽性細胞は多く観察された（Fig. 4, Table 2）。

#### 4. 計測学的観察

Table 2には、計測学的観察の結果をまとめた。まず、各病態パラメータ（腎小体の直径、糸球体の硬化、間質への細胞浸潤および間質の線維化）間の相関関係を解析すると、有意な相関は猫の糸球体硬化スコアと $\alpha$ -SMA発現スコアの間認められた（ $r=0.97$ ,  $P<0.01$ ）（Fig. 5A）。犬および猫の他のパラメータ間には有意な相関は認められなかった。

COX-2に関しては、犬では、総陽性細胞数（視野）と $\alpha$ -SMA発現スコアの関連に直線関係がみら

Table 2. Quantitative results of histopathology and immunohistochemistry.

No.	Species	<sup>1</sup> Diameter of renal corpuscles	Score of glomerular sclerosis	Score of cell infiltration	Score of interstitial fibrosis	Score of $\alpha$ -SMA expression	Number of COX-2 positive cells				Number of NOS-1 positive cells			
							<sup>2</sup> Tubules	<sup>2</sup> Interstitial	<sup>3</sup> Glomeruli	<sup>2</sup> Total	<sup>2</sup> Tubules	<sup>2</sup> Interstitial	<sup>3</sup> Glomeruli	<sup>3</sup> Total
1	Dog	167.89	38.57	34.62	169.57	83.33	2.93	0.04	0.09	3.04	1.69	<sup>4</sup> ND	ND	1.69
2	Dog	220.00	75.18	18.18	138.89	182.61	63.64	0.21	ND	63.86	0.91	ND	ND	0.91
3	Dog	148.34	28.24	104.00	154.55	9.09	4.10	0.85	ND	4.95	6.61	ND	ND	6.61
4	Dog	130.30	15.94	23.07	157.89	243.75	141.38	0.31	ND	141.69	1.42	ND	ND	1.42
5	Dog	159.77	289.47	155.56	300.00	243.48	98.75	1.67	ND	100.42	3.95	ND	ND	3.95
6	Dog	156.72	22.92	33.33	200.00	150.00	147.00	1.23	ND	156.71	1.31	ND	ND	1.31
7	Dog	168.40	14.29	5.56	125.00	6.66	26.79	0.14	ND	26.93	4.78	ND	ND	4.78
8	Dog	140.21	62.67	36.00	178.95	300.00	79.67	0.53	1.25	81.20	2.52	ND	ND	2.52
9	Cat	170.69	289.74	300.00	226.67	343.75	1.56	0.05	ND	1.61	37.56	ND	ND	37.56
10	Cat	210.82	77.78	200.00	153.33	145.45	3.31	0.14	ND	3.44	10.00	ND	ND	10.00
11	Cat	144.27	89.66	35.71	68.75	200.00	ND	1.00	0.50	0.53	62.88	ND	ND	62.88
12	Cat	143.51	68.42	100.00	50.00	118.18	1.77	0.09	1.76	3.05	3.53	ND	ND	3.53
13	Cat	164.34	117.95	155.17	250.00	195.00	0.39	0.14	N.D.	36.82	22.64	ND	ND	22.64
14	Cat	139.70	19.59	38.10	29.17	93.75	4.42	2.16	0.03	6.67	7.00	ND	ND	7.00

<sup>1</sup>μm. <sup>2</sup>Number/×400 field. <sup>3</sup>Number/glomerulus. <sup>4</sup>Not detected

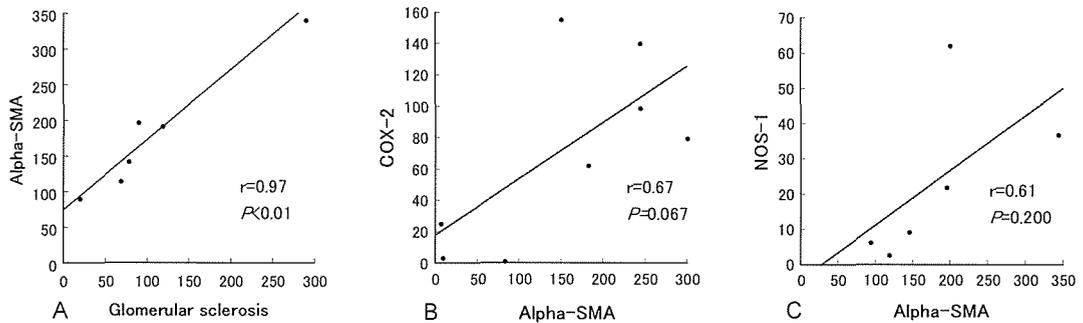


Fig. 5. Correlations between each parameter. (A)  $\alpha$ -SMA vs glomerular sclerosis in cats. (B) COX-2 vs  $\alpha$ -SMA in dogs. (C) NOS-1 vs  $\alpha$ -SMA in cats.

れたが有意な相関は得られなかった( $r=0.67, P=0.067$ )。他の病態パラメータとCOX-2陽性細胞数との間には直線関係はみられなかった。猫では、他の全ての病態パラメータとの間にCOX-2陽性細胞数は直線関係を示さなかった (Fig. 5B)。

NOS-1に関しては、犬では、他の全ての病態パラメータとの間にNOS-1陽性細胞数は直線関係を示さなかった。猫では、総陽性細胞数 (1視野) と $\alpha$ -SMA発現スコアの関連に直線関係がみられたが有意な相関は得られなかった ( $r=0.61, P=0.200$ )。他の病態パラメータとNOS-1陽性細胞数との間には直線関係はみられなかった (Fig. 5C)。

考 察

本研究では、TGF調節因子であり糸球体過剰濾

過メカニズムへの関与が疑われているCOX-2とNOS-1について、腎臓における発現と病態との関連性を犬および猫の臨床例で検索した。

COX-2は、誘導型のCOXといわれ炎症部位や腫瘍組織で発現するが[13, 14, 17], 腎臓では恒常的に発現してGFR調節や糸球体傍細胞からのレニン分泌調節を担う[8, 12, 13]。健康な腎臓では、総じて遠位尿管上皮 (主に緻密斑) に局在することが知られており[1, 6], 本研究でも犬, 猫ともにCOX-2陽性反応は猫の1例 (No. 11) を除き緻密斑に観察された。また、症例により様々であるが、緻密斑以外の遠位尿管, 集合管上皮, 間質, 糸球体にも陽性反応は観察された。特に、犬では猫に比べてCOX-2陽性細胞数が多く、その動態と腎臓の病態との関連性が疑われた。事実、腎線維化の活動性マーカーである $\alpha$ -SMAとの間には、統計学的には有意でなかつ

たが、比較的高い正の相関係数 ( $r=0.67$ ) が検出された。 $\alpha$ -SMAは、間質線維芽細胞や尿管上皮が形質転換した筋線維芽細胞で産生され[9]、猫においては $\alpha$ -SMAの発現スコアが慢性腎不全進行の指標となることが報告されている[21]。しかしながら、本研究では、犬において $\alpha$ -SMAの発現と腎臓の病態パラメータとの間に相関関係を認めることが出来ず、COX-2陽性細胞数と $\alpha$ -SMAとの関係について病理学的意義を見出すことは出来なかった。実験動物では、高血圧および糖尿病モデルラットにおけるCOX-2の発現がtransforming growth factor- $\beta$ やvascular endothelial growth factorなど腎障害誘発メディエーターの発現に関与することが報告されており[7]、犬の腎臓のCOX-2発現動態についても、糸球体過剰濾過メカニズムへの関与のみならずこれらメディエーターの発現との関連性について今後検討が必要であろう。なお、猫については、犬に比べてCOX-2陽性細胞が明らかに少なく、病態との関連性も認められなかった。

NOS-1は、神経型NOS (nNOS) ともいわれ、神経系に多く発現する構成型NOSである。健全な腎臓では、COX-2同様、総じて遠位尿管上皮(主に緻密斑)に局在してGFRの調節を担っている[18]。本研究でも、犬、猫ともにNOS-1陽性反応は緻密斑に観察された。また、緻密斑以外の遠位尿管や集合管上皮にも陽性細胞は観察されたが、COX-2とは異なり、間質や糸球体に陽性反応はみられなかった。犬と猫を比較すると、COX-2とは逆に、猫で陽性細胞数が多く検出され、 $\alpha$ -SMAの発現スコアとの間に比較的高い正の相関係数 ( $r=0.61$ ) が検出された(統計学的には有意でない)。さらに、猫では、 $\alpha$ -SMAの発現スコアは糸球体硬化のスコアとに間に高い相関関係が認められた ( $r=0.97$ ,  $P<0.01$ )。これら結果から、猫の糸球体硬化の進行にはNOS-1の過剰産生が関与していることが疑われる。一方、犬においてはNOS-1の発現と腎疾患との関連性は示唆されなかった。

腎疾患におけるCOX-2およびNOS-1の過剰発現は、1および2型糖尿病モデルラットで明らかにされている[17, 22, 23]。さらに、1型糖尿病ラットでみられる糸球体過剰濾過がNOS-1選択的阻害剤7-NIの投与により抑制されること[14]、COX-2の作用はNOS-1と類似かつ相互関係があること[8, 13]、が報告されている。これらの報告および本研究の結果から、犬および猫の慢性腎不全では、各々COX-2

とNOS-1が過剰発現し、これが糸球体過剰濾過の発生に関与すると考えられる。この仮説を証明するためには、今後更に症例を重ねて検討を行う必要があるだろう。

## 引用文献

- [1] Adegboyega, P.A. and Ololade, O.: Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 12, 71-74 (2004)
- [2] Brenner, B and, Milford. E.L.: Nephron underdosing: a programmed cause of chronic renal allograft failure. *Am. J. Kidney Dis.*, 21, 66-72 (1993)
- [3] Brenner, B.M., Lawler, E.V. and Mackenzie, H.S.: The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int.*, 49, 1774-1777 (1996)
- [4] Brown, S.A., Brown, C.A., Jacobs, G., Stiles, J., Hendi, R.S. and Wilson, S.: Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor benazepril in cats with induced renal insufficiency. *Am. J. Vet. Res.*, 62, 375-383 (2001)
- [5] Brown, S.A., Crowell, W.A., Brown, C.A., Barsanti, J.A. and Finco, D.R.: Pathophysiology and management of progressive renal disease.: *Vet. J.*, 154, 93-109 (1997)
- [6] Campean, V., Theilig, F., Paliege, A., Breyer, M. and Bachmann, S.: Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 285, F19-32 (2003)
- [7] Cheng, H.F., Wang, C.J., Moeckel, G.W., Zhang, M.Z., McKanna, J.A. and Harris, R.C.: Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int.*, 62, 929-939 (2002)
- [8] Deng, A., Wead, L.M. and Blantz, R.C.: Temporal adaptation of tubuloglomerular feedback: effects of COX-2. *Kidney Int.*, 66, 2348-2353 (2004)
- [9] Geleilate, T.J., Costa, R.S., Dantas, M. and Coimbra, T.M.: Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34, 985-991 (2001)
- [10] Gonin-Jmaa, D. and Senior, D.F.: The hyperfiltration theory: progression of chronic renal failure and the effects of diet in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 207, 1411-1415 (1995)
- [11] Grauer, G.F., Greco, D.S., Getzy, D.M., Cowgill, L.D., Vaden, S.L., Chew, D.J., Polzin, D.J. and Barsanti, J.A.: Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *J. Vet. Intern. Med.*, 14, 526-533 (2000)
- [12] Harris, R.C. and Breyer, M.D.: Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 281, F1-11 (2001)
- [13] Ichihara, A., Imig, J.D., Inscho, E.W. and Navar, L.G.: Cyclooxygenase-2 participates in tubular flow-dependent

- afferent arteriolar tone: interaction with neuronal NOS. *Am. J. Physiol.*, 275, F605-612 (1998)
- [14] Ito, A., Uriu, K., Inada, Y., Qie, Y.L., Takagi, I., Ikeda, M., Hashimoto, O., Suzuka, K., Eto, S., Tanaka, Y. and Kaizu, K.: Inhibition of neuronal nitric oxide synthase ameliorates renal hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 138, 177-185 (2001)
- [15] Jones, C.J. and Budsberg, S.C.: Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 217, 721-729 (2000)
- [16] Khan, K.N., Knapp, D.W., Denicola, D.B. and Harris, R.K.: Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet. Res.*, 61, 478-481 (2000)
- [17] Komers, R., Lindsley, J.N., Oyama, T.T., Allison, K.M. and Anderson, S.: Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 279, F573-583 (2000)
- [18] Ollerstam, A. and Persson, A.E.: Macula densa neuronal nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res.*, 56, 189-196 (2002)
- [19] Pestili de Almeida, E.M., Piche, C., Sirois, J. and Dore, M.: Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J. Histochem. Cytochem.*, 49, 867-875 (2001)
- [20] Rajj, L., Azar, S. and Keane, W.: Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.*, 26, 137-143 (1984)
- [21] Sawashima, K., Mizuno, S., Mizuno-Horikawa, Y., Shimada, A., Kudo, T. and Kurosawa, T.: Expression of alpha-smooth muscle actin and fibronectin in tubulointerstitial lesions of cats with chronic renal failure. *Am. J. Vet. Res.*, 61, 1080-1086 (2000)
- [22] Shin, S.J., Lai, F.J., Wen, J.D., Hsiao, P.J., Hsieh, M.C., Tzeng, T.F., Chen, H.C., Guh, J.Y. and Tsai, J.H.: Neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in outer medulla of streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Diabetologia*, 43, 649-659 (2000)
- [23] Yabuki, A., Tahara, T., Taniguchi, K., Matsumoto, M. and Suzuki, S.: Neuronal nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in diabetic nephropathy of type 2 diabetic OLETF rats. *Exp. Anim.*, 55, 17-25 (2006)

## Expression of Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide Synthase-1 in Kidneys of Dogs and Cats with Renal Failure

Akira YABUKI<sup>1)†</sup>, Yasuyuki ENDO<sup>2)</sup>, Makoto FUJIKI<sup>3)</sup>, Noriaki MIYOSHI<sup>4)</sup>,  
Mitsuharu MATSUMOTO<sup>1)</sup> and Shusaku SUZUKI<sup>1)</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Veterinary Anatomy, <sup>2</sup>Laboratory of Veterinary Internal Medicine,  
<sup>3</sup>Laboratory of Veterinary Surgery, <sup>4</sup>Laboratory of Veterinary Pathology)

### Summary

In the present study, we investigated the kidneys of necropsied dogs (n=8) and cats (n=6) histopathologically and immunohistochemically in order to clarify whether expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and nitric oxide synthase-1 (NOS-1) correlate with the progression of renal failure. Histopathological changes and expressions of COX-2 and NOS-1 in the kidneys were evaluated by quantitative manners. In the dogs, a high correlation between the number of COX-2 positive cells and the score of  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA), a marker of renal fibrosis progression, was detected. On the contrary, a high correlation was detected between the number of NOS-1 positive cells and the score of SMA in the cats. The present findings suggested that the pathological mechanisms in the progression of renal failure are different between dogs and cats.

**Key words** : cat, COX-2, dog, NOS-1, renal failure

†: Correspondence to: Akira YABUKI (Laboratory of Veterinary Anatomy)

Tel: 099-285-8712 E-mail: yabu@agri.kaoshima-u.ac.jp