

9531 食塩投与による急性腎不全軽減効果に関する研究

助成研究者：菱田 明 (浜松医科大学 医学部)

共同研究者：大石 和久 (浜松医科大学)

遅 継銘 (浜松医科大学)

山本 龍夫 (浜松医科大学)

(目的) 食塩負荷がシスプラチン(CP)誘発急性腎不全を軽減する機序を検討した。

(方法) CP 5mg/kgを雄Sprague-Dawleyラットの腹腔内に投与して急性腎不全を発症させ、投与5日後に急性腎不全の程度を検討した。実験1：無処置(C群)、生理食塩水(生食)飲水(S群)、生食飲水+deoxycorticosterone acetate 10mg/kg/week投与(SD群)の3群につき、5週間の前処置後CPを投与した。また、別のラットを用い、C群、S群につき、CP投与前後に尿を採取し、尿中cGMPを測定した。実験2：無処置(C群)、アンジオテンシン変換酵素阻害薬MK-422(MK群)、アンジオテンシン受容体拮抗薬L-158809(L群)投与を10日間行い、その5日目にCPを投与し、CP投与5日後に急性腎不全の程度を検討した。実験3：無処置(C群)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)選択的分解酵素阻害剤UK-79300投与(UK群)、生食飲水(S群)、S+UK投与群に分け、生食飲水はCP投与の1週間より開始し、UKの投与はCP投与の3日前より開始し連日投与した。(結果) 実験1：血清クレアチニン値(Cr)はC群(5.3 ± 0.5 mg/dl)に比し、S群とSD群で有意に低値であった(S; 2.5 ± 0.2 mg/dl, SD; 2.0 ± 0.4 mg/dl)。血漿レニン活性はS群とSD群で、腎内レニン含量はSD群で有意に低値であった。形態学的に髄質外層部の尿細管壊死の程度はSD群で有意に軽減された。尿中プラチナ排泄は3群間で有意差はみられなかった。尿中cGMP排泄量は生食負荷により変化しなかったが、CP投与後はC群に比べS群で有意に高く保たれた。実験2：C群、MK群、L群のCr値、尿細管壊死の程度に有意差はみられなかった。血漿レニン活性はMK群とL群で有意に増加し、レニン系の抑制が確認されたが、腎内レニン含量は3群間で有意差はみられなかった。実験3：Cr値はC群とUK群に比べS群とS+UK群で有意に低値であった。尿中cGMP排泄量に有意差はみられなかった。

(結論) 1) 食塩負荷はCP誘発急性腎不全を軽減した。2) 食塩負荷によるCP誘発急性腎不全軽減効果に腎内レニン系の抑制が関与している可能性は否定できず、今後、腎内レニン系を抑制した条件下でCP誘発急性腎不全が軽減されるか否かを検討する必要がある。3) 食塩負荷によるCP誘発急性腎不全軽減効果にANPの分泌増加が関与している可能性は低い。4) 食塩負荷によるCP誘発急性腎不全軽減効果にCPの尿中排泄増加が関与する可能性は低い。

9531 食塩投与による急性腎不全軽減効果に関する研究

助成研究者：菱田 明 (浜松医科大学 医学部)

共同研究者：大石 和久 (浜松医科大学)

遅 継銘 (浜松医科大学)

山本 龍夫 (浜松医科大学)

1. 研究目的

生理食塩水の投与が種々の原因による急性腎不全を予防または軽減することが知られているが、その機序の詳細は明らかでない。シスプラチンは非乏尿性の急性腎不全を起こすことが知られているが、シスプラチンによる急性腎不全もまた生理食塩水投与により軽減されることが臨床及び動物実験の結果から報告されている。

生理食塩水負荷がシスプラチン誘発急性腎不全を軽減する機序としては、1)シスプラチンの尿中排泄の増加、2)レニン-アンジオテンシン系の抑制、3)心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の増加、4)内皮依存性血管拡張因子(EDNO)の増加、その他などを介している可能性が考えられる。しかし、こうした点に踏み込んで急性腎不全軽減効果の機序を検討した報告はない。

そこで、今回の研究では、ラットでのシスプラチン誘発急性腎不全モデルを用い、食塩負荷による急性腎不全軽減効果の機序を検討した。

2. 研究方法

雄Sprague-Dawleyラットを用いて実験1-3を行った。

実験1-生理食塩水負荷実験-

ラットを、無処置(CP, N=7)群、0.9%食塩水飲水(Saline+CP, N=6)群、生理食塩水飲水にdeoxycorticosterone acetateを10mg/kg/week皮下投与した(DOCA+CP, N=7)群に分け、これらの処置を5週間行った後、シスプラチン(CP)5mg/kgを腹腔内投与し、その5日後に急性腎不全の程度を検討した。シスプラチン投与前後、メタボリックケージにて尿を採取した。また、別のラットを用い、無処置(CP, N=9)群、生理食塩水飲水(Saline+CP, N=9)群につき、生理食塩水負荷後の1週目と5週目、シスプラチン投与後の1日目、3日目、5日目の尿をメタボリックケージにて採取し、尿中cGMP排泄量を測定した。

実験2ーレニン系抑制実験ー

レニン系の抑制がシスプラチン誘発急性腎不全に及ぼす影響を検討するため、ラットを無処置(CP, N=8)群、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(MK-422 5mg/kg)経口投与群(MK+CP, N=8)群、アンジオテンシン受容体拮抗薬(L-158809 0.3mg/kg)経口投与(L+CP, N=9)群に分け、MK-422、L-158809をそれぞれ10日間投与した。その5日目にシスプラチン5mg/kgを腹腔内投与し10日目に急性腎不全の程度を検討した。

実験3ー心房性ナトリウム利尿ペプチド作用の増強実験ー

ラットを、無処置(CP, N=13)群、心房性ナトリウム利尿ペプチドの分解酵素atriopeptidaseの選択的阻害剤であるUK-79300 10mg/kg経口投与(UK+CP, N=8)群、生理食塩水飲水(Saline+CP, N=15)群、生理食塩水飲水にUK-79300を投与した(Saline+UK+CP, N=8)群に分けた。生理食塩水負荷はシスプラチン5mg/kg腹腔内投与の1週間より開始し、UK-79300の投与はシスプラチン投与の3日前より開始し連日投与した。シスプラチン投与5日後に急性腎不全の程度を検討した。

各実験群において、飲水は自由にさせた。血圧はtail cuff法により収縮期血圧を測定した。シスプラチン投与5日目にペントバルビタール麻酔(30mg/kg)下、ラットの腹部を正中切開し、両側腎を結紮摘出し、腹部大動脈より採血を行った。腎臓は摘出後、一部をホルマリン固定し、残りを直ちに液体窒素に入れ、冷凍保存した。

クレアチニンは酵素法、電解質は自動分析装置、レニン活性はRIA法、シスプラチン濃度はプラチナ濃度として原子吸光法で測定した。腎内レニン含量の測定には、両側腎摘出24-48時間後のラット血清を基質として使用した。腎皮質を4°Cでホモジナイズした後、腎摘ラット血清を添加し、RIA法でレニン活性を測定した。ホルマリン固定腎は、パラフィン包埋し、PAS染色及びproliferating cell nuclear antigen(PCNA)の免疫組織染色を行った。結果は、平均 ± 標準誤差で示し、検定はANOVA、Benferroni検定を用いた。

3. 研究結果

実験1ー生理食塩水負荷実験ー

シスプラチン投与前の体重は、CP群 407±5 g、Saline+CP群 411±11 g、DOCA+CP群 410±8 gと3群間に有意差はなかった。シスプラチン投与5日後の体重も、CP群 367±6 g、Saline+CP群 371±11 g、DOCA+CP群 379±10 gと3群間で有意差はなかった。シスプラチン投与前、tail cuff法にて測定した収縮期血圧は、CP群 106±5 mmHg、Saline+CP群 116±4 mmHg、DOCA+CP群 118±2 mmHgと3群間で有意差はなかった。シスプラチン投与前の尿中ナトリウム排泄量は、CP群 1.6±0.1 mEq/day、Saline+CP群 6.7±0.6 mEq/day、DOCA+CP群 7.1±0.9 mEq/dayとCP群に比べ、Saline+CP群と

DOCA+CP群で有意に増加した。

シスプラチン投与5日目の血清クレアチニン値は、CP群 5.3 ± 0.5 mg/dl、Saline+CP群 2.5 ± 0.2 mg/dl、DOCA+CP群 2.0 ± 0.4 mg/dlとCP群に比べ、Saline+CP群とDOCA+CP群で有意に低かった(Fig. 1)。

シスプラチン誘発急性腎不全では腎髄質外層外帯に選択的な尿細管壊死が起こる。この部位のnecrosis indexはFig. 2に示す如く、CP群に比べ、Saline+CP群では有意な改善はなかったが、DOCA+CP群でわずかであるが有意な軽減がみられた。

シスプラチン投与5日後の血漿レニン活性は、CP群に比べ、Saline+CP群とDOCA+CP群で有意に低下した。腎内レニン含量は、CP群に比べ、Saline+CP群で低下傾向にあったが有意に低下せず、DOCA+CP群で有意に低下した(Fig. 3)。

シスプラチン投与後24時間の尿中プラチナの排泄量は、CP群 333.8 ± 63.0 μ g/day、Saline+CP群 348.1 ± 54.7 μ g/day、DOCA+CP群 598.4 ± 193.1 μ g/dayと3群間で有意差はみられなかった。また、プラチナの尿中濃度も3群間で有意差はみられなかった。

腎皮質及び腎髄質外層外帯のPCNA陽性細胞数は3群間で有意差はみられなかった。

Fig. 4に示す如く、尿中cGMP排泄量は無処置群に比べ、生理食塩水負荷後1週目と5週目では有意差はみられなかった。しかし、シスプラチン投与後では、CP群に比べ、Saline+CP群において尿中cGMP排泄量は有意に高く保たれていた。

実験2—レニン系抑制実験—

MK-422及びL-158809投与前の収縮期血圧は、CP群 112 ± 3 mmHg、MK+CP群 113 ± 3 mmHg、L+CP群 112 ± 3 mmHgと3群間で有意差は認められなかった。しかし、5日後のシスプラチン投与前の収縮期血圧は、CP群 111 ± 2 mmHg、MK+CP群 93 ± 2 mmHg、L+CP群 102 ± 2 mmHgと、CP群に比べMK+CP群とL+CP群で有意に低下した。

シスプラチン投与5日目の血清クレアチニン値は、CP群 4.1 ± 0.3 mg/dl、MK+CP群 4.3 ± 0.6 mg/dl、L+CP群 4.6 ± 0.7 mg/dlと3群間で有意差はみられなかった(Fig. 5)。また、腎髄質外層外帯のnecrosis indexも3群間で有意差はみられなかった。

シスプラチン投与5日後の血漿レニン活性は、CP群に比べ、MK+CP群とL+CP群で有意に増加し、MK-422やL-158809投与によるレニン系の抑制が確認された。しかし、腎内レニン含量はMK-422やL-158809投与により上昇しなかった(Fig. 6)。

実験3—心房性ナトリウム利尿ペプチド作用の増強実験—

シスプラチン投与5日目の血清クレアチニン値は、CP群 4.3 ± 0.8 mg/dl、UK+CP群 3.7 ± 0.6 mg/dl、Saline+CP群 2.0 ± 0.2 mg/dl、Saline+UK+CP群 1.9 ± 0.3 mg/dlであり、有意ではなかったが、Saline+CP群及びSaline+UK+CP群で低下傾向にあった(Fig. 7)。

尿中cGMP排泄量は、UK+CP群でUK-79300投与前 23.6 ± 3.3 nmol/day、UK-79300投与3日後 23.7 ± 2.1 nmol/dayと有意な変化は認められず、Saline+UK+CP群でも、生理

食塩水負荷前 20.4 ± 3.2 nmol/day、生理食塩水負荷後 35.4 ± 6.3 nmol/day、生理食塩に加えてUK-79300投与後 35.3 ± 4.6 nmol/dayと有意な変化は認められなかった (Fig. 8)。

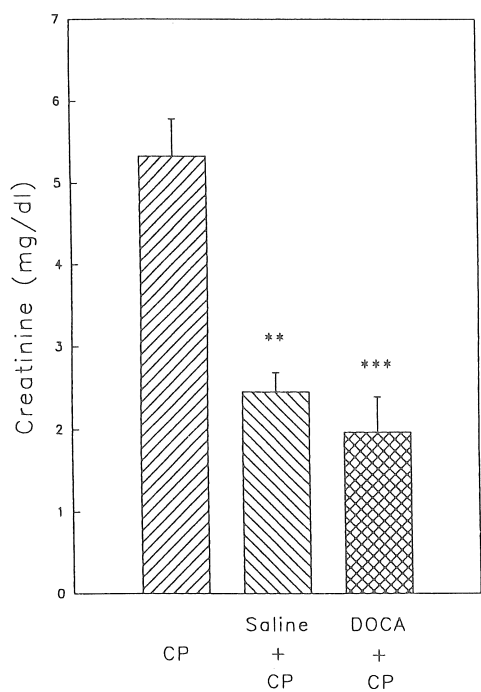


Fig.1 Effect of saline loading and DOCA-salt treatment on serum creatinine concentration in cisplatin (CP)-induced acute renal failure. **P<0.01 vs CP. ***P<0.001 vs CP.

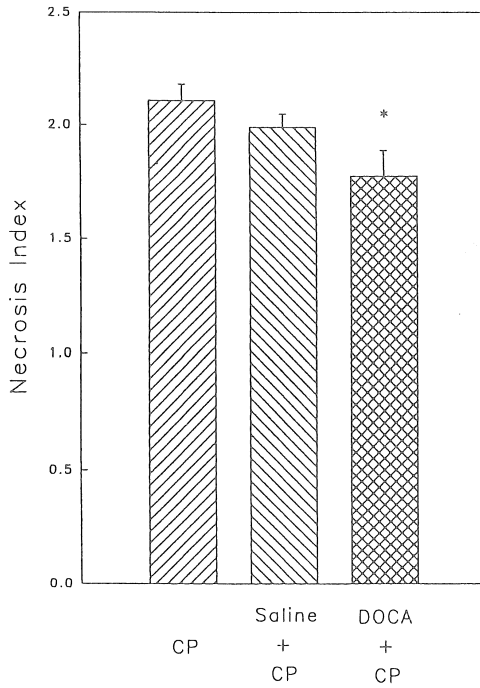
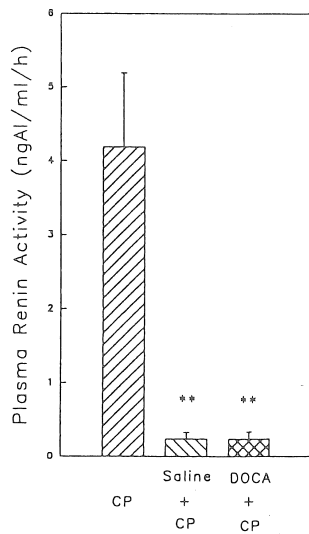


Fig.2 Effect of saline loading and DOCA-salt treatment on necrosis index of outer stripe of outer medulla in cisplatin (CP)-induced acute renal failure. *P<0.05 vs CP.

Plasma Renin Activity



Renal Renin Content

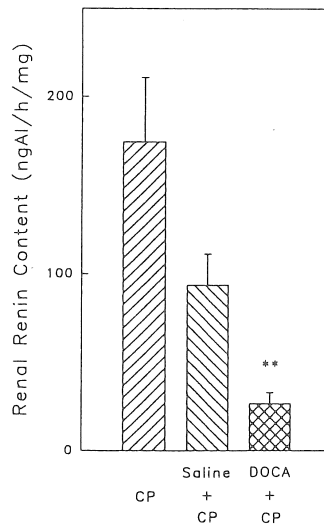


Fig.3 Effect of saline loading and DOCA-salt treatment on plasma renin activity and renal renin content in cisplatin (CP)-induced acute renal failure. **P<0.01 vs CP.

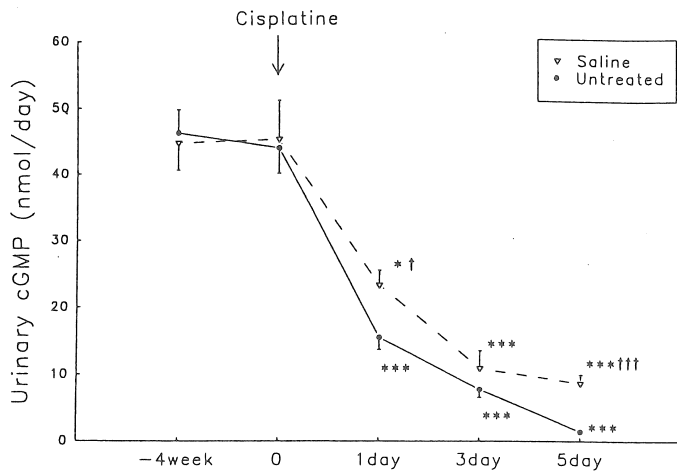


Fig.4 Effect of saline loading on urinary cGMP excretion in cisplatin - induced acute renal failure. *P<0.05 vs day 0. ***P<0.001 vs day 0. †P<0.05 vs untreated rats. †††P<0.001 vs untreated rats.

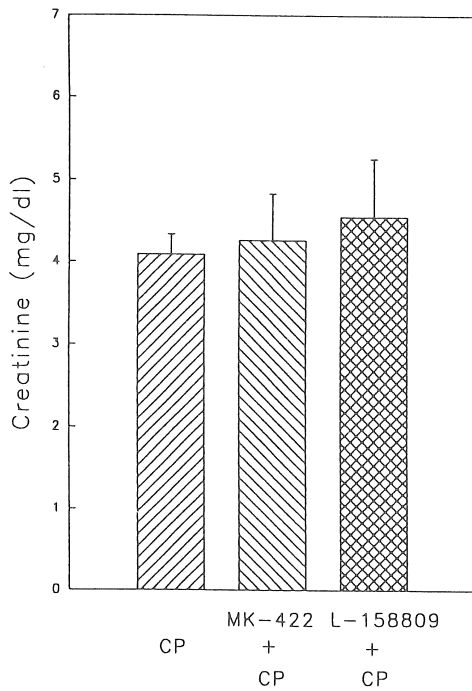


Fig.5 Effect of MK-422 and L-158809 on serum creatinine concentration in cisplatin (CP)-induced acute renal failure.

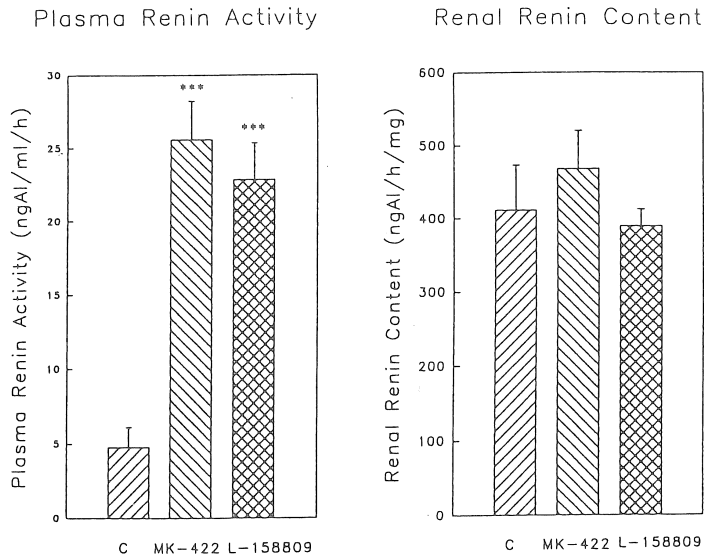


Fig.6 Effect of MK-422 and L-158809 on plasma renin activity and renal renin content in cisplatin(CP)-induced acute renal failure. ***P<0.001 vs CP.

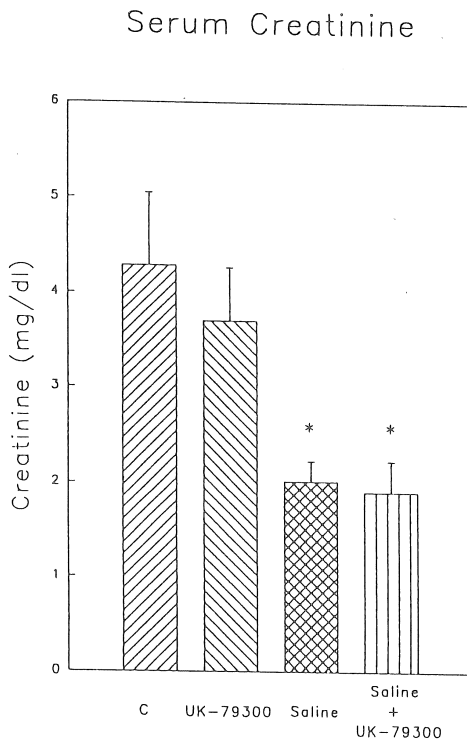


Fig.7 Effect of UK-79300, saline loading, saline loading plus UK-79300 on serum creatinine concentration in cisplatin(CP)-induced acute renal failure. *P<0.05 vs CP.

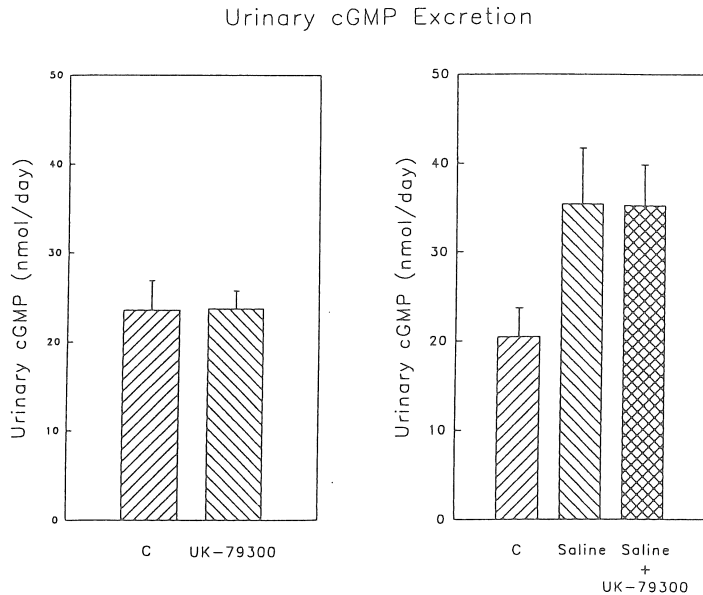


Fig.8 Effect of UK-79300, saline loading, saline loading plus UK-79300 on urinary cGMP excretion.

4. 考察

食塩負荷が種々の原因による急性腎不全を軽減することが報告されているが、その機序に関してはほとんど検討されていない。今回の研究では、ラットへの生理食塩水負荷がシスプラチン誘発急性腎不全を軽減することを確認した後、その機序を検討した。

シスプラチン5mg/kg腹腔内投与により非乏尿性の急性腎不全が惹起された。予備実験において、シスプラチン投与後経時的に血清クレアチニン値の推移を検討したところ、5日後に血清クレアチニン値が最高値となったため、本研究ではシスプラチン投与5日後の急性腎不全の程度を検討した。生理食塩水負荷及び生理食塩水+DOCA投与はシスプラチン投与後の血清クレアチニン値の上昇を有意に抑制した。また、生理食塩水+DOCA投与では腎組織の障害も有意に軽減された。これらのことから我々のモデルでも食塩水負荷がシスプラチンによる急性腎不全を軽減することが確認された。

食塩負荷によりレニン-アンジオテンシン系が抑制されることが知られているため、食塩負荷によるシスプラチン誘発急性腎不全軽減効果がレニン-アンジオテンシン系の抑制を介する可能性がある。今回の実験でも、生理食塩水負荷及び生理食塩水+DOCA投与による急性腎不全軽減効果は血漿レニン活性の低下と腎内レニン含量の減少を伴った。さらに、腎内レニン含量がより強く抑制された生理食塩水+DOCA負荷群では生理食塩水単独群とは異なり腎組織障害の改善が認められた。

生理食塩水負荷による急性腎不全軽減効果がレニン系の抑制を介する可能性を検討するため、アンジオテンシン変換酵素阻害薬のMK-422とアンジオテンシン受容体拮抗薬のL-158809が急性腎不全軽減効果を有するか否かを検討した。これらの薬剤の投与によってシスプラチンによる血清クレアチニン値の上昇は抑制されなかった。この際、MK-422及びL-158809投与群で血漿レニン活性は有意に上昇したことより、血液中のアンジオテンシンIIは抑制されていたことが示唆される。しかし、腎内レニン含量はこれらの薬剤によっても増加はみられず、腎内アンジオテンシンII系は抑制されていなかった可能性がある。これらの結果からは腎内レニン-アンジオテンシン系の抑制がシスプラチン誘発急性腎不全を軽減するか否かは結論できないと考えられ、今後は腎内アンジオテンシンIIが抑制される条件を用いて検討する必要があると残されている。

食塩負荷によるナトリウム利尿がシスプラチンの尿中排泄を増加させたり、尿中シスプラチン濃度を低下させて急性腎不全を軽減している可能性がある。しかし、シスプラチン投与後24時間の尿中プラチナ排泄量及び尿中濃度は生理食塩水負荷や生理食塩水+DOCA投与で有意な変化を示さなかったことから、尿中シスプラチン排泄促進や尿中シスプラチン濃度の低下が腎不全の軽減に重要な役割を果たしている可能性は少ない。

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)のアナログがシスプラチン誘発急性腎不全を軽減したとの報告があることより、食塩負荷はANPを増加させて急性腎不全を軽減している可能性がある。今回の検討でも、生理食塩水負荷群ではシスプラチン投与後の尿中cGMP排泄が比較的高値に保たれていた。ANPの作用はcGMPを介することが知られており、生理食塩水負荷によりANP分泌量が増加していた可能性がある。しかし、ANPの作用を増強するUK-79300を投与したが急性腎不全抑制効果は認められなかった。食塩負荷時にANPの拮抗薬を投与して急性腎不全軽減効果が消失するか否かを検討することができればより直接的な証拠を得ることになるが、ANP拮抗薬が入手困難なため、今回の検討期間では行うことができなかった。

近年、epidermal growth factor(EGF)やinsulin-like growth factor(IGF-I)などの成長因子を外因性に投与すると細胞増殖を促し、急性腎不全が軽減されるとの報告がある。今回、我々は生理食塩水投与が何らかの機序を介して尿細管細胞増殖を促し、急性腎不全を軽減させる可能性があるか否かを検討するため、シスプラチン投与後の細胞増殖の指標としてPCNA陽性細胞をカウントしたが、5日目の時点では

有意差を認めなかったことからこうした可能性は少ないと考えられる。しかし、今後、より早期のPCNA陽性細胞の検討が必要である。

以上の結果をまとめると、

- 1) 食塩負荷はシスプラチン誘発急性腎不全を軽減した。
- 2) 食塩負荷によるシスプラチン誘発急性腎不全軽減効果に腎内レニン-アンジオテンシン系の抑制が関与している可能性は否定できない。
- 3) 食塩負荷によるシスプラチン誘発急性腎不全軽減効果にANPの産生増加が関与している可能性は低い。
- 4) 食塩負荷によるシスプラチン誘発急性腎不全軽減効果にシスプラチンの尿中排泄増加が関与する可能性は低い。

5. 今後の課題

腎内レニン-アンジオテンシン系を抑制した条件でシスプラチン誘発急性腎不全が軽減されるか否かを検討する必要がある。

The effects of salt loading on cisplatin-induced acute renal failure in rats

Akira Hishida, Kazuhisa Ohishi, Chi Ji Ming, Tatsuo Yamamoto

First Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

Studies were performed to examine the effects of salt loading on cisplatin-induced acute renal failure (ARF) in Sprague-Dawley rats. Both saline-drinking(saline group) and DOCA(10mg/kg/week) plus saline-drinking(DOCA-salt group) for five weeks attenuated the increase in serum creatinine concentration compared with water-drinking rats. Tubular damage induced by cisplatin was attenuated in DOCA-salt group but not in saline group. Plasma renin activity was significantly suppressed in both groups, but renal renin content was significantly suppressed only in DOCA-salt group. No significant difference was found in urinary platinum excretion between water-drinking, saline and DOCA-salt groups. Animals receiving saline-drinking showed higher urinary cGMP excretion following cisplatin injection compared with water-drinking rats. Neither angiotensin converting enzyme inhibitor nor angiotensin receptor antagonist attenuated ARF. Both agents increased plasma renin activity, indicating suppressed plasma angiotensin II. However, intrarenal renin content was not affected by these two drugs, suggesting no significant modification of intrarenal renin-angiotensin system. Atriopeptidase inhibitor did not affect urinary cGMP excretion and ARF in water-drinking and saline-drinking rats. These findings suggest that salt loading attenuates cisplatin-induced ARF. This effect was caused through neither the enhanced urinary cisplatin excretion nor the potentiation of ANP action. Further studies are necessary to study the effects of suppression of intrarenal renin-angiotensin system.