

9740 シスプラチン誘発急性腎不全に対する食塩水負荷の効果

助成研究者：菱田 明 (浜松医科大学 第一内科)
共同研究者：宮地 武彦 (浜松医科大学 第一内科)
周 華 (浜松医科大学 第一内科)
大石 和久 (浜松医科大学 第一内科)
米村 克彦 (浜松医科大学 第一内科)

シスプラチンは強力な抗悪性腫瘍薬として現在臨床的に広く用いられている。しかし、その腎毒性のために、投与量が制限されているばかりか、腎毒性軽減目的で行われる食塩水負荷が出来ない疾患(心不全、腎不全)を有する患者では投与が行われないうちにある。

近年、腎毒性物質による急性腎不全時にアポトーシスが出現することが報告されているが、我々は虚血やウラニウムによる急性腎不全での尿細管細胞障害にアポトーシスによる細胞死が関与することを報告した。今回、シスプラチンによる急性腎不全発症機序の解明の1助とする目的でシスプラチン誘発急性腎不全におけるアポトーシスの発現と食塩水負荷がアポトーシスに及ぼす影響を検討した。シスプラチン 5mg/Kg の静脈内投与により血清クレアチニン値は投与前の 0.61 ± 0.07 mg/dl から3日目 0.88 ± 0.22 mg/dl、5日目 2.00 ± 0.46 mg/dl へ上昇した。食塩水投与群ではそれぞれ 0.55 ± 0.03 、 0.96 ± 0.12 、 1.15 ± 0.16 mg/dl、 0.61 ± 0.07 mg/dl であり、5日目の血清クレアチニン値の上昇は食塩水投与により有意に抑制された。PAS 染色標本で評価した組織障害度は食塩水非投与群で投与前の 0.23 ± 0.10 から3日目には 2.51 ± 0.13 、5日目には 3.63 ± 0.27 へ増加した。食塩水投与群においてもそれぞれ 0.22 ± 0.13 、 2.59 ± 0.13 、 3.41 ± 0.18 と増加し、組織障害度には両群間に差はなく、食塩水負荷はシスプラチンによる組織障害度を軽減しなかった。5日目の腎組織 DNA 電気泳動では ladder 現象がみられ、アポトーシスの発現が確認された。TUNEL 法で半定量したアポトーシス細胞数は食塩水負荷により軽減されなかった。以上の結果から、食塩水負荷はシスプラチンによる腎機能低下を軽減するが、組織障害の程度、アポトーシスの程度には影響を与えないことが明らかとなった。

9740 シスプラチン誘発急性腎不全に対する食塩水負荷の効果

助成研究者：菱田 明 (浜松医科大学 第一内科)
共同研究者：宮地 武彦 (浜松医科大学 第一内科)
周 華 (浜松医科大学 第一内科)
大石 和久 (浜松医科大学 第一内科)
米村 克彦 (浜松医科大学 第一内科)

1. 研究目的

シスプラチンは強力な抗悪性腫瘍薬として現在臨床的に広く用いられている。しかし、この薬が臨床的に広く用いられるようになったのは、「シスプラチン投与前後に生理食塩水その他によって十分な hydration を行うことによってシスプラチンによる副作用としての腎障害の発現を大幅に減少させる」という Hayes DM 等の報告によるところが多い。彼らの報告以来、シスプラチン投与時には必ず生理食塩水または 1/2 生理食塩水による 1 日 2 L 以上の補液がなされるようになり、大量補液を行わなかった場合の腎障害の頻度(血清クレアチニンが 2 mg/dl 以上への上昇)が 40 ~ 100 %であったのに比し、現在では血清クレアチニン値 2 mg/dl 以上になるものが 4 ~ 5 %、血清クレアチニン値 5 mg/dl 以上に上昇するものが 1 ~ 2 %程度となっている (1)。食塩水負荷による急性腎不全予防はある程度効果が期待できる上、安価であるという特徴を持つが、この方法にもいくつかの問題がある。一つは、心不全や腎機能障害があつて大量補液が行いにくい患者においてはシスプラチンの投与が回避され、悪性腫瘍になった場合にシスプラチンの恩恵に与ることができないことである。第 2 にシスプラチン投与を繰り返した場合、腎障害が徐々に進行し数回の使用後は腎障害のため使用が不可能になることが多いという点である。シスプラチンによる急性腎不全の発症予防法が確立されることはシスプラチンを使用できる患者の範囲を拡大するとともに、より大量の使用を可能にすることによって悪性腫瘍の治療効果の飛躍的向上をもたらす可能性がある。

近年、細胞死には壊死のほかアポトーシスによるものがあることが知られるようになってきた。アポトーシスの急性腎不全発症における役割については必ずしも明かではなく、また食塩水負荷をはじめとして急性腎不全軽減に用いられる治療法が急性腎不全発症期におけるアポトーシスの発現にどのような影響を及ぼすか、についてはほとんど検討されていない。

今回我々はシスプラチンによる急性腎不全の発症機序の解明及び予防法の開発の一助とする目的でシスプラチン誘発急性腎不全モデルを用い、食塩水負荷が尿細管組織障害及びアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

雄 Sprague-Dawley ラット（350～400 g）を用い、シスプラチン 5 mg/kg の静脈内投与により急性腎不全を惹起した。1群には飲用水として水道水を投与したのに対し、2群ラットには 0.9% 食塩水を飲用水としてシスプラチン投与1週間前から投与した。

シスプラチン投与前、投与後3日、5日目にラットを麻酔下採血し、血清クレアチニン値を測定した。また同時に摘出した腎を用い、組織障害度の評価、DNA電気泳動、TUNEL陽性細胞数の検討を行った。

血清クレアチニン値の測定は酵素法にて測定した。

組織障害度の評価には、摘出した腎を10%ホルマリンに固定した後、PAS染色し、腎髄質外層外帯の尿細管細胞障害の程度を、障害細胞が認められない尿細管 0点、障害された細胞が25%未満の尿細管 1点、障害された細胞が25%以上50%未満の尿細管 2点、障害された細胞が50%以上75%未満の尿細管 3点、障害された細胞が75%以上の尿細管 4点、と5段階に分けてスコア化し、尿細管を100個それぞれについてスコアを算出し、尿細管一つあたりの点数を組織障害度 tubular damage score として表した。

DNA電気泳動は、摘出した腎の一部（50～100 mg）を剃刀で細切した後、100 μ l の PBS とともに homogenate し、1 ml の 7 M guanidine hydrochloride を加え、その懸濁液を15分間、10000 \times g で遠心し、その上清についてフェノール・クロロホルム抽出を2回、その後エタノール沈殿を行いDNAを抽出した。抽出したDNAは1 \times TE に溶解し、RNase 処理した。分光光度計で280 nm と 260 nm との吸光度を測定し、OD 260/OD 280 の比が1.7～1.9であることを確認した後、DNAの濃度を算出した。2%アガロースゲルにて1 μ g あたり 30 μ g の DNA について電気泳動し、エチジウム・ブロマイドで染色した後、UV トランスイルミネーターで発色させ、DNAの電気泳動パターンを観察した。

TUNEL陽性細胞数の測定には、10%ホルマリンに固定した摘出腎で、3 μ m のパラフィン切片を作製し、ApopTag in situ Apoptosis Detection Kit (Oncor, MD, USA) を用いて、DNAの断片化を検出した。

顕微鏡下400 \times 視野で、腎髄質外層外帯について無作為に計50カ所選択し、TUNEL陽性細胞数をカウントした後、1視野あたりの平均陽性細胞数を算出した。

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。

3. 研究結果

シスプラチン投与により、食塩水非投与群では体重は投与前の389.0 \pm 29.7 g から3日目346.5 \pm 6.2 g、5日目318.6 \pm 10.6 g へ減少した。食塩水投与群でも同様に投与前の371.6 \pm 23.4 g から3日目341.6 \pm 7.6 g、5日目343.4 \pm 6.2 g へ減少し、両群間に有意差を認めなかった。

血清クレアチニン値は食塩水非投与群でシスプラチン投与前の 0.61 ± 0.07 mg/dl から3日目 0.88 ± 0.22 mg/dl、5日目 2.00 ± 0.46 mg/dl へ上昇し、急性腎不全の発症を認めた。食塩水投与群ではそれぞれ 0.55 ± 0.03 、 0.96 ± 0.12 、 1.15 ± 0.16 mg/dl、 0.61 ± 0.07 mg/dl であり、5日目の血清クレアチニン値は食塩水投与群で有意に低値であり、食塩水投与によりシスプラチンによる血清クレアチニン値の上昇が軽減された (Fig. 1)。

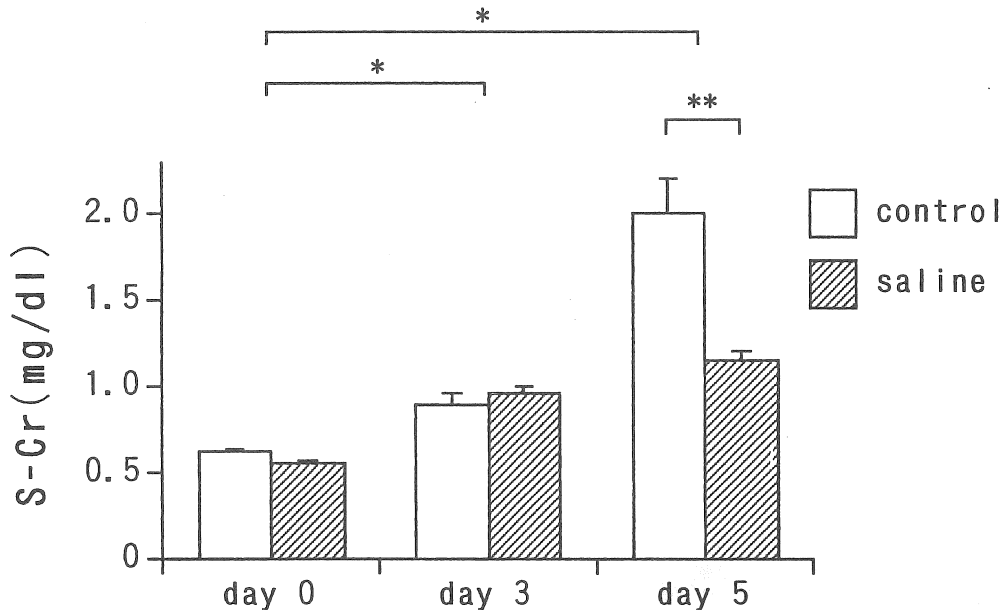


Fig. 1 Effects of saline loading on serum creatinine(S-Cr) concentration in cisplatin-induced acute renal failure.

* $P < 0.01$ vs day 0. ** $P < 0.01$ vs control.

PAS 染色標本で評価した組織障害度は食塩水非投与群で投与前の 0.23 ± 0.10 から3日目には 2.51 ± 0.13 、5日目には 3.63 ± 0.27 へ増加した。食塩水投与群においてもそれぞれ 0.22 ± 0.13 、 2.59 ± 0.13 、 3.41 ± 0.18 と増加し、組織障害度には両群間に差はなく、食塩水負荷はシスプラチンによる組織障害度を軽減しなかった (Fig. 2)。

DNA電気泳動では Fig.3 に示す如くシスプラチン投与後5日目の腎組織で ladder 現象が観察され、シスプラチン誘発急性腎不全においてもアポトーシスが誘導されることが確

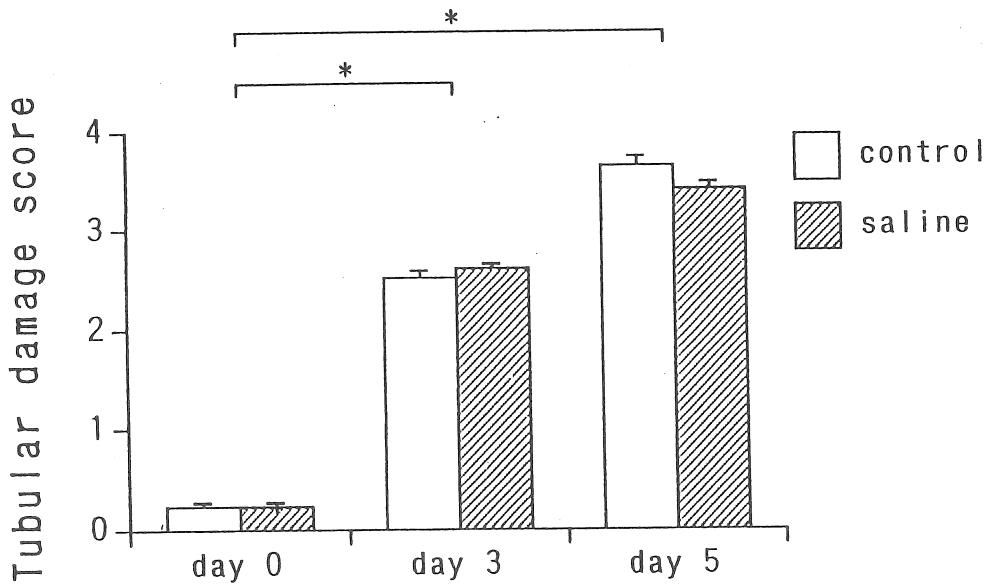


Fig. 2 Effects of saline loading on tubular damage score in outer stripe of outer medulla in cisplatin-induced acute renal failure.

* $P < 0.01$ vs day 0.

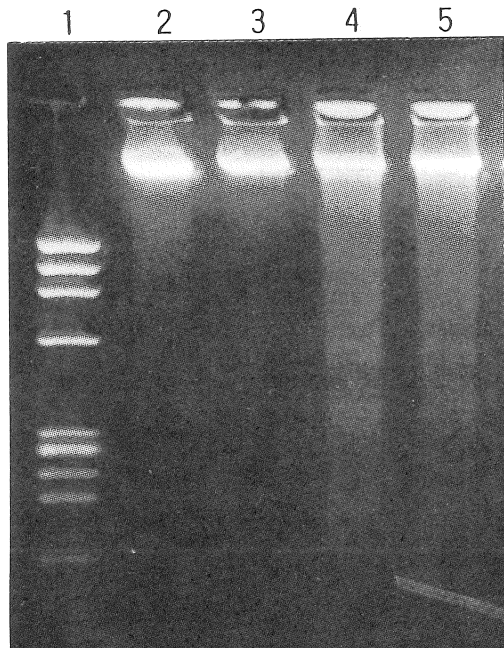


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of DNA ($30 \mu\text{g}/\text{lane}$) extracted from kidneys in cisplatin-induced acute renal failure. Lanes are : (1) molecular size marker ($\phi x174$), (2) control, day 3, (3) saline, day 3, (4) control, day 5, (5) saline, day 5

認された。アポトーシスの程度を定量的に評価するために行った TUNEL 陽性細胞数のカウントでは、食塩水非投与群でシスプラチン投与前に 0.19 ± 0.04 であったが、3日目には 2.12 ± 0.27 、5日目 4.08 ± 0.24 へ増加し、アポトーシス細胞が組織障害度と平行して増加することが認められた。食塩水投与群でも3日目 2.00 ± 0.22 、5日目 3.92 ± 0.30 へ増加し、その増加の程度に食塩水非投与群と有意差はなかった (Fig. 4)。

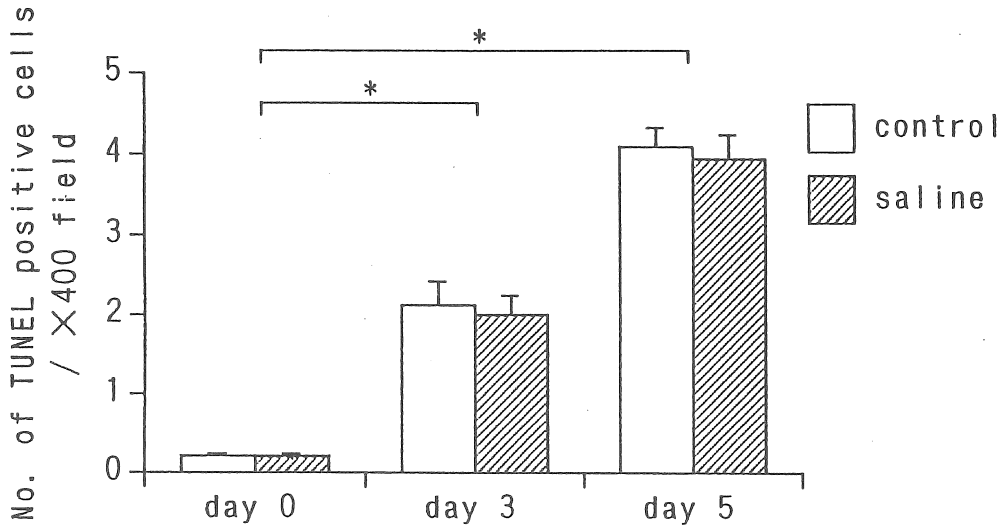


Fig. 4 Effects of saline loading on the number of TUNEL positive cells in cisplatin-induced acute renal failure.

* $P < 0.01$ vs day 0.

4. 考察

シスプラチンをはじめとする腎毒性物質による腎障害は食塩水負荷で軽減することが知られているが、その機序は必ずしも明かではない。我々は平成7年度のソルト・サイエンス財団による助成研究においてシスプラチンによるラット腎機能の低下が食塩水負荷によって軽減されることを報告し、同時に食塩水負荷がレニン系の抑制や心房性 Na ペプチドの増加を介して腎機能軽減に関与する可能性を検討し報告した (3)。また食塩水負荷のみの場合、腎機能低下を軽減する効果を有するにも関わらず、組織障害の有意な軽減を来さないことを報告した。臨床的にはシスプラチンは繰り返し投与した場合に腎組織変化と

腎機能低下が徐々に進行していくことが知られており、シスプラチンによる尿細管組織障害への食塩水負荷の影響についてより詳細な検討が必要とされている。

シスプラチン、ウラニウム、水銀などの腎毒性物質や虚血による急性腎不全においてアポトーシスが生じることは報告されており、急性腎不全における尿細管細胞死が壊死のみでなくアポトーシスを介するものもあることは広く認められるようになってきた。急性腎不全の発症機序や予防法の開発を考える上で、細胞死の中でアポトーシスがどの程度の割合を占めるのかを明らかにすることは重要であるが、この点についての検討はほとんどなされていない。我々は虚血性急性腎不全(4)および酢酸ウラニウム誘発急性腎不全で(5)のモデルを用い、両モデルにおいてアポトーシスが認められること、腎障害の程度とアポトーシスの程度が相関することを報告し、アポトーシスによる細胞死が急性腎不全における尿細管細胞障害で重要な役割を果たすことを示唆してきた。アポトーシスが急性腎不全の発症のなかの単なる付随現象でなく、重要な役割を果たすのであれば、急性腎不全の予防策がアポトーシス抑制にどの程度有用であるかを判断することも、この分野での今後の発展にとって重要である。

今回我々は、シスプラチン誘発急性腎不全において食塩水負荷がアポトーシスの発現にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果、シスプラチンによる腎障害時にアポトーシスがおきることをDNA電気泳動における ladder の出現で確認した。また、食塩水負荷は血清クレアチニン値の上昇を抑制するにも関わらず、組織障害の程度やアポトーシスの程度は全く軽減しなかった。このことは、食塩水負荷による急性腎不全予防効果が機能に限定されたものであり、シスプラチンの繰り返し投与の場合の腎障害の進行を止め得ないことを改めて示したものである。

5. 今後の課題

今回の検討ではシスプラチンがアポトーシスを起こす機序、食塩水が腎機能低下を抑制する機序については明かとならなかった。最近我々はシスプラチンによる急性腎不全の発症に活性酸素の産生を伴うこと、活性酸素の消去剤が急性腎不全の程度を機能面のみでなく形態学的にも軽減することを報告した(6)。また、その中で superoxide anion は腎血流維持に働くこと、hydroxyl radical は脂質過酸化を介して尿細管障害に強く関連することを示した。活性酸素はアポトーシスを誘導する因子の一つであることが知られていることから、活性酸素の消去剤がアポトーシスに及ぼす影響、アポトーシス誘導に関与する活性酸素種の同定などを行うことにより、シスプラチン誘発急性腎不全におけるアポトーシス誘導機序の解明と予防法の開発の一助となる可能性がある。

6. 文献

- 1) 菱田 明：薬剤性腎障害.井村裕夫ほか監修、最新内科学体系プログレスシリーズ 10 腎・泌尿器疾患、中山書店、103-112.1997
- 2) Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJT: Antibodies to CD3/T receptor complex induced death by apoptosis in immature T cell in thymic culture. *Nature* 337: 181-184, 1989
- 3) 菱田 明、大石和久、遅継銘、山本龍夫：食塩投与による急性腎不全軽減効果に関する研究。平成7年度助成研究報告集。ソルト・サイエンス研究財団。79-89,1997
- 4) Nakajima T, Miyaji T, Kato A, Ikegaya N, Yamamoto T, Hishida A: Uninephrectomy reduces apoptotic cell death and enhances renal tubular cell regeneration in ischemic renal failure in rats. *Am J Physiol* 271: F846-853, 1996
- 5) Sano K, Miyaji T, Matsushima H, Fujigaki Y, Ikegaya N, Yonemura K, Hishida A: The roles of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure. presented in "International Symposium on Acute renal Failure" 1997
- 6) Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A: The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Labo Clin Med* (in press)

The attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by saline loading.

Akira Hishida, Takehiko Miyaji, Zhou Hua, Katsuhiko Yonemura

First Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

This study was performed to evaluate the effect of saline loading on apoptotic cell death in cisplatin-induced acute renal failure in rats. Acute renal failure was induced by the intravenous injection of 5 mg/Kg cisplatin in Sprague-Dawley rats. Following the injection of cisplatin, serum creatinine increased from 0.61 ± 0.07 mg/dl to 0.88 ± 0.22 and 2.00 ± 0.46 mg/dl on days 3 and 5, respectively. Saline drinking did not affect the serum creatinine on day 3 (0.96 ± 0.12 mg/dl), but significantly suppressed on day 5 (1.15 ± 0.16 mg/dl, $p < 0.001$). In contrast to the effect of saline load on renal function, saline loading did not lessen morphological change evaluated as the tubular damage score. Agarose gel electrophoresis of DNA from kidneys 5 days after the cisplatin injection disclosed the so-called "ladder" pattern, indicating the development of apoptosis in this model. The apoptotic cell death was evaluated semi quantitatively using terminal deoxytransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL method). The number of TUNEL positive cells increased from 0.19 ± 0.04 to 2.12 ± 0.27 and 4.08 ± 0.24 on days 3 and 5. Saline loading did not attenuate the increase in the number of TUNEL positive cells (2.00 ± 0.22 and 3.92 ± 0.30 on days 3 and 5, respectively).

These findings suggest that saline loading attenuate the functional impairment but does not affect the morphological damage and the induction of apoptosis in cisplatin-induced acute renal failure in rats.