

抗ガン薬 cisplatin 誘発腎傷害の種差について

— 特に腎皮質内 Pt 濃度について —

片山理恵子¹、永田沙織¹、河合成直²、山下哲郎²、世良耕一郎³、古濱和久¹

¹岩手大学獣医学課程

020-8550 岩手県盛岡市上田三丁目 18-8

²岩手大学応用生物化学課程

020-8550 岩手県盛岡市上田三丁目 18-8

³岩手医科大学サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

Cisplatin は白金 (Pt) の錯体で、腫瘍細胞の DNA に付加体(Adduct)を形成して抗がん作用を発揮するが、一方では腎傷害が dose-limiting toxicity となっている^{1,2)}。しかし、この腎傷害に動物種差が存在することは殆ど知られていない。そこで、まず cisplatin をマウス、ラットおよびウサギに静脈内単回投与し、5 日間観察して腎を臨床病理学的に調べた。その結果、腎傷害用量はマウスで 45 mg/m²、ラットで 22.5 mg/m²、ウサギで 96 mg/m² であり、明瞭な動物種差がみられた³⁾。本研究は投与 5 日目における腎皮質 Pt 濃度を particle induced X-ray emission (PIXE) で測定し、腎傷害における動物種差の裏づけを目的に行った。

2 材料および方法

2.1 動物

実験には 6 週齢の雄性 BALB/c 系マウス (実験開始時体重: 19-26 g)、6 週齢の雄性 Fischer 344 系ラット (120-150 g) および 3 カ月齢の雄性 ニュージランドホホワイト (NZW) ウサギ (2.5-3 kg) を用いた。これら動物は日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入し、室温 22±3°C、湿度 55±25%、12 時間明暗サイクル (午前 8 時から午後 8 時) の一定環境下の実験動物室で飼育した。実験期間中、マウスおよびラットは固形飼料 (MEQ、オリエンタル酵母工業株式会社、東京)、ウサギはウサギ・モルモット用固形飼料 (ラボ R グロー、日本農産工業株式会社、神奈川) と水道水を自由に摂取させた。なお、全ての動物の飼育、管理および使用は岩手大学動物実験委員会の許可のもとに“岩手大学動物実験に関する指針”に従って実施した。

2.2 薬物

Cisplatin (シズプラチ注[®]、0.5 mg/mL 含有、ロット No. PE03、マルコ製薬、愛知) は市販のものをそのまま使用した。用

量は予試験を基に、マウスは22.5、45 および 90 mg/m² (n=5)、ラットは11.3、22.5、45 および 90 mg/m² (n=5)、ウサギは12、24、48、96 および 192 mg/m² (n=2) に設定し、静脈内単回投与5日後 (day 5) に麻醉下 (マウスとラットはエーテル、ウサギはキシラジン/ケタミン)、放血安楽殺した。なお、本研究では投与日を day 1 とした。

2.3 腎皮質 Pt 濃度の測定

Day 5 に腎を摘出し、左腎皮質をハサミでくり抜き、0.1 g を秤量した。この試料をガラス筒 (直径: 25 cm、高さ: 6 cm) に入れて-30°Cで凍結させ、一昼夜かけて凍結乾燥し、固形物の重量を測定した。固形物に濃硝酸の1 mL を添加し、ガラス管上に時計皿を乗せ 100°Cのホットプレート上で1-2 時間放置して可溶化・乾固した。その後、1 N 硝酸の2 mL を添加し、その1 mL を測定用サンプルとした。Pt 濃度の測定は岩手医科大学サイクロtronセンター (滝沢、岩手) で particle induced X-ray emission (PIXE) を用いて測定した。なお、本研究では腎内 cisplatin 濃度を Pt 量とし、単位は µg/g 乾燥重量とした。

2.4 統計処理

得られた値は平均 (mean) と標準誤差 (SEM) で表し、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、有意差が認められた場合、Dunnett の多重比較検定を行った。危険率 5% 未満で差異が認められた場合には有意差があると判断した。なお、ウサギは n=2 のため平均値で表した。

3 結果

Day 5 における各動物の腎皮質 Pt 濃度を Fig.1 に示した。マウスおよびラットともほぼ用量相関的に腎皮質 Pt 濃度が増加した。ウサギでは 12-96 mg/m² まではほぼ用量相関的に増加したが、192 mg/m² で 76.2 µg/g と減少傾向を示した。

腎傷害用量における腎皮質 Pt 濃度はマウス (腎傷害用量: 45 mg/m²) で 16.2 µg/g、ラット (22.5 mg/m²) で 26.8 µg/g、ウサギ (96 mg/m²) で 81.7 µg/g であった。

なお、実験期間中、死亡がマウスの 90 mg/m² で 2 例、ラットの 90 mg/m² で全例 (うち 1 例は切迫屠殺)、ウサギでは 192 mg/m² で全例みられたが、ラットの 1 例 (切迫屠殺例) 以外は Pt 測定を行なわなかった。

4 考察

先の実験結果では、cisplatin による腎傷害は臨床病理学的に顕著な血清尿素窒素 (UN) および creatinine の上昇を伴う腎皮質尿細管上皮の変性・壊死と尿細管腔への cell debris の出現で特徴づけられた³⁾。また、腎傷害性はラット > マウス > ウサギの順に強く、明瞭な動物種差が認められた。一方、本実験条件下の腎皮質 Pt 濃度は ウサギ > ラット > マウスの順であり、腎傷害性との間に大きな相違がみられた。一般的にウサギは腎傷害物質 (例えば、水銀や gentamicin) に対しマウスやラットに比べ高感受性であることはよく知られているが、本結果はこれらとも相反していた。このことから、腎臓内に取り込まれた Pt がグルタチオンあるいはシステインと結合し、特定の転換酵素 (たとえば、cysteine-S-conjugate β-lyase) により transformation を受け、活性代謝物 (reactive metabolite) が生成されたと考えるのが妥当と考えられた。文献的にも、reactive metabolite の存在が示唆されている^{1,2)}。したがって、本研究で観察された腎皮質 Pt 濃度の動物種差は reactive metabolite により説明できると考えられた。たとえば、ウサギでは腎皮質 Pt 濃度が高いにもかかわらず、腎での転換酵素活性が低いために reactive metabolite が生成されず、腎傷害が出現し難かったとの仮説が成り立つ。どちらにしても、今後これら仮説を検証するためには、腎の転換酵素とともに reactive metabolite の測定が必要と考えられた。

なお、ウサギの高用量 (92 mg/m²) 投与で腎皮質 Pt 濃度に減少傾向 (76.2 µg/g) がみられたが、これは重篤な腎傷害発現のために腎血流 (GFR や RPF の低下) が低下し、Pt の腎分布が減少したためと推察された。

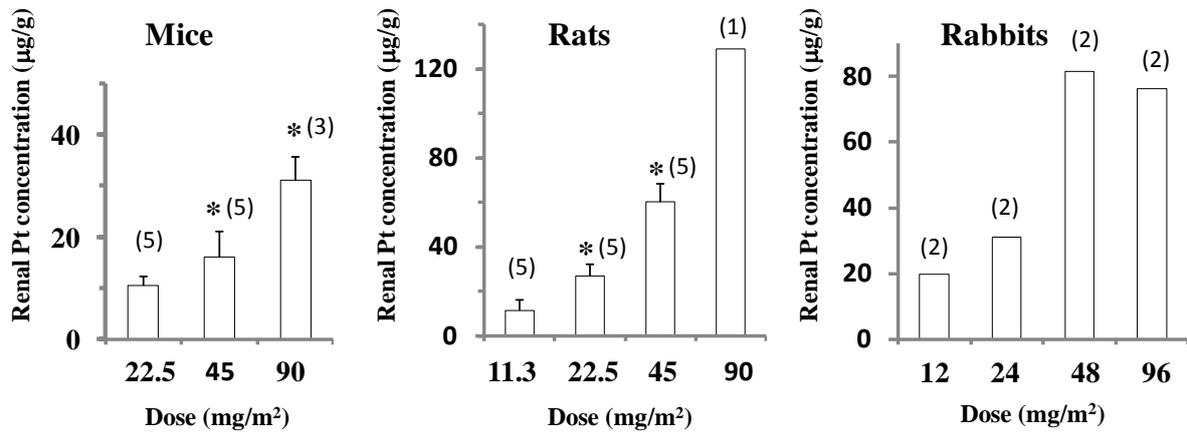


Fig.1 Renal platinum (Pt) concentrations on day 5 in mice, rats and rabbits treated intravenously with a single injection of cisplatin. Renal Pt concentrations were measured by a PIXE method. Two mice and four rats given 90 mg/m² of cisplatin died by day 5. One rat receiving 90 mg/m² of cisplatin was killed on day 4 because of moribund conditions. Parentheses represent the number of animals used. The values show the mean ± SEM. *p<0.05 vs. a lowest dose in each species.

5 結論

Cisplatin 腎傷害の動物種差には腎皮質 Pt 濃度だけでは説明がつかず 腎内での transformation に伴う reactive metabolite の関与を考慮する必要がある。

参考文献

- 1) Hanigan MH, Devarajan P (2003) Cisplatin nephrotoxicity: Molecular mechanisms. *Cancer Ther* 1:47-61.
- 2) Pinzani V, Bressolle F, Haug IJ, Galtier M, Blayac JP (1994) Cisplatin induced renal toxicity and toxicity-modulating strategies: A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 35:1-9.
- 3) 片山理恵子、永田沙織、佐藤洋、山下哲郎、河合成直、世良耕一郎、古濱和久 (2009) 白金系抗がん剤 シスプラチンによる腎傷害の動物種差について、第 148 回日本獣医学会年次集会 (鳥取)。

Species differences in renal platinum (Pt) concentrations in mice, rats and rabbits given a single intravenous injection of cisplatin

R.Katayama¹, S.Nagata¹, S.Kawai², T.Yamashita², K.Sera³, K.Furuhama¹

¹Department of Veterinary Medicine, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

²Department of Agro-Bioscience, Faculty of Agriculture, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58, Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

To better understand a species difference in cisplatin nephrotoxicity, we measured the renal platinum (Pt) concentrations in mice, rats and rabbits given a bolus injection of cisplatin, a platinum chemotherapeutic agent. The renal Pt concentrations were determined by a particle induced X-ray emission (PIXE) method. The ranking order of renal Pt concentrations was rabbits > rats > mice, unlike that of the nephrotoxic potentials (rats > mice > rabbits). These results demonstrate that the species difference in cisplatin nephrotoxicity may be attributed to a reactive metabolite yielded presumably by a certain enzyme such as cysteine-S-conjugate β -lyase.