

The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松島, 秀樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1075

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 222号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	松島秀樹		
論文題目	The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats (ラットの cisplatin 誘発急性腎不全における活性酸素の関与)		

博士(医学) 松島秀樹

論文題目

The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats

(ラットの cisplatin 誘発急性腎不全における活性酸素の関与)

論文内容の要旨

〔目的〕

Cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin) はすぐれた抗腫瘍作用を発揮するが、腎に対する副作用が投与量を決める上で重要な因子となっており、腎障害の予防方法の開発が望まれている。近年、cisplatin による腎障害の発症に、活性酸素の関与が示唆されている。

今回、1) cisplatin 誘発急性腎不全の発症に活性酸素が関与するか否か、2) free radical scavenger による予防効果が、①腎血流量、②尿細管細胞障害、③尿細管細胞の障害からの回復、などのいずれを介するのかを検討した。

〔方法〕

雄の SD ラット 280~320g に cisplatin 5mg/kg を単回静脈内投与して急性腎臓不全を惹起させた。ラット 137匹を 6群に分け、hydroxyl radical scavenger として dimethylthiourea (DMTU) と sodium benzoate を、superoxide dismutase (SOD) として従来の unmodified free SOD (F-SOD) と lecithinized SOD (L-SOD) の効果を検討した。即ち、a) 正常対照群、b) cisplatin 単独投与群、c) cisplatin+DMTU (cisplatin 投与 1 時間前に DMTU 500mg/kg、以後 125mg/kg を 1 日 2 回腹腔内投与)、d) cisplatin+sodium benzoate (初回 600mg/kg、以後 300mg/kg を 1 日 2 回腹腔内投与)、e) cisplatin + F-SOD (30mg/kg を 1 日 3 回皮下投与)、f) cisplatin+L-SOD (3000U/kg を 1 日 1 回静脈内投与) の 6 群である。

腎障害は、cisplatin 投与 5 日後の血清クレアチニン値 (s-Cr)、イヌリンクリアランス (Cin) と、腎組織障害度で評価した。脂質過酸化の程度は 6 時間後の腎組織内の malondialdehyde (MDA) で検討した。また、cisplatin 投与後 24 時間蓄尿中の cisplatin 排泄量を測定した。

次に、各 radical scavenger の有効性の機序を検討するため、cisplatin 投与 5 日後に、腎血流量を電磁血流計を用いて測定した。また、nitric oxide (NO) の biological marker である cGMP の尿中排泄量を測定した。5 日後の尿細管壊死の程度を PAS 染色標本を用いた 400 倍鏡検下で、髓質外層外帯 (50 視野中) に認められる 50% 以上の細胞が壊死に陥っている尿細管数を数えて組織障害の半定量的評価とした。また、尿細管障害の生化学的指標として、cisplatin 投与 2 日目、4 日目の尿中 NAG 排泄量を測定した。尿細管細胞障害からの回復の指標として、cisplatin 投与 48 時間後の腎組織での proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現を、抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色で調べた。

PCNA 陽性細胞の半定量は、髓質外層外帯の尿細管 200 個あたりで 5 点数法の合計で行った。結果は mean \pm SEM で表し、統計学的検討には Dunn 多重比較法を用いた。

〔結果〕

Cisplatin 投与により 5 日後の s-Cr は対照群の 0.47 ± 0.02 から 2.4 ± 0.12 mg/dl へ有意に上昇した。DMTU、sodium benzoate、L-SOD の投与にて s-Cr は、各々 0.56 ± 0.04 、 1.60 ± 0.12 、 1.69 ± 0.14 mg/dl と有意に抑制されたが、F-SOD では 2.80 ± 0.17 mg/dl で無効であった。Cisplatin 投与 5 日後の Cin

は対照群の 1.33 ± 0.11 から 0.06 ± 0.01 ml/min/kidney に低下した。DMTU の投与にて Cin は 0.82 ± 0.17 ml/min/kidney に有意に改善し、L-SOD にも 0.25 ± 0.05 ml/min/kidney と改善の傾向が見られた。活性酸素の産生の指標である腎内 MDA は cisplatin 投与 6 時間後に有意な増加があった。DMTU の投与にて MDA の有意な抑制が見られたが、L-SOD は影響を与えなかった。Cisplatin 投与後 24 時間の蓄尿中の cisplatin 排泄量は、cisplatin 単独投与、DMTU 治療、L-SOD 治療の 3 群間で有意差を認めなかった。以上より、cisplatin 誘発急性腎不全の発症に活性酸素が関与していることが示唆された。

Cisplatin 投与 5 日後の腎血流量は有意に低下した。DMTU の投与は腎血流量に影響しなかったが、L-SOD では cisplatin 投与後の腎血流の改善傾向が認められた。DMTU あるいは L-SOD 単独投与では、腎血流量に対する影響はなかった。尿中 cGMP は、cisplatin 投与により有意に減少した。DMTU の投与では有意な変化はなかったが、L-SOD では cGMP の有意な増加が見られた。

Cisplatin 投与 5 日後の腎組織障害度は、DMTU 投与により有意に改善し、sodium benzoate でも軽減傾向があった。L-SOD と F-SOD は腎組織障害度を改善しなかった。尿中 NAG 排泄量は、cisplatin 投与後に経時的に増加した。DMTU はその増加を有意に抑制したが、L-SOD では有意な抑制は見られなかった。

Cisplatin 投与 48 時間後、髄質外層外帯の PCNA 発現は有意に増加した。DMTU では PCNA 陽性細胞がさらに有意に増加したが、L-SOD では cisplatin 単独投与群に比較して有意な変化はなかった。DMTU あるいは L-SOD の単独投与では、PCNA の発現は影響を受けなかった。

〔結論〕

- 1) Cisplatin 誘発急性腎不全の発症に活性酸素が関与している。
- 2) DMTU、sodium benzoate と L-SOD は cisplatin による腎機能の低下を軽減した。
- 3) DMTU による腎機能改善効果は、尿細管細胞障害の抑制および障害された細胞の回復促進を介し、L-SOD の効果は腎血行動態の改善を介する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

Cisplatin はすぐれた抗癌作用があり、抗癌剤として臨床的にしばしば用いられている薬剤である。しかし、副作用として腎障害を来すことが知られており、その投与量の決定上、重大な問題が生じる。最近の研究で、この cisplatin による腎障害の発症に活性酸素・フリーラジカルが関与していることが明らかにされつつある。申請者は、本研究でこの点をより深く検討しようとした。

この研究では、ラットに cisplatin 投与を行った群と、種々のフリーラジカルスカベンジャー併用投与群を比較して、ラジカルスカベンジャーによる cisplatin の急性腎障害の抑制効果を調べた。hydroxyl radical scavenger としては、dimethylthiourea (DMTU) と sodium benzoate を用い、そして superoxide dismutase (SOD) としては 2 つのタイプのもの、即ち unmodified free SOD と新しく開発されたレシチン化 SOD を用いて、4 種類のラジカルスカベンジャーの効果を調べた。

本論文では腎障害の評価に多くの指標を用いられている。血清クレアチニン値、イヌリンクリアランスを測定し、腎血流量、NO の biological marker である cGMP の尿中排泄量、尿細管障害の指標としての尿中 NAG 排泄量についても測定した。組織内の変化としては、脂質過酸化を示す malondialdehyde (MDA) の測定、尿細管の病理学的変化の半定量評価を行い、尿細管細胞障害からの回復の指標として

腎組織での proliferating cell nuclear antigen(PCNA)の発現を抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法によって評価している。このように、腎障害の評価に多くの生化学的、生物学的及び病理学的指標が用いられていることも論文審査会で評価された。

本研究により明らかにされたことは、

- 1) DMTU とレシチン化 SOD は cisplatin による腎機能障害を抑制した。このことより、cisplatin による腎障害には hydroxyl radical と superoxide anion が関与していること。
- 2) DMTU による腎機能障害の抑制は、hydroxyl radical の除去による尿細管障害の軽減の他に、尿細管細胞障害からの回復の促進を介していることが考えられた。
- 3) レシチン化 SOD による腎機能障害の抑制効果は、腎血流量の改善を介していると考えられ、これにはレシチン化 SOD が superoxide anion の除去をすることにより NO が保存されて、これが腎血流量の維持をしているという機序が考えられた。

本研究は cisplatin 誘発急性腎不全の発症には活性酸素が関与していることを、詳細な方法を用いてより明確にし、この分野での研究に貢献したことが論文審査会で評価された。

本論文の審査の過程で次のような質疑が行われた。

- 1) レシチン化 SOD と他の SOD (リボソーム SOD) との特性の比較について
- 2) 血清及び尿中の過酸化脂質 (TBA 値) の測定はしてあるか
- 3) PCNA は増殖機能の指標を表すだけか
- 4) DMTU 投与後の病理像では 5 日目で既に再生像がある。それ以前ではどうか
- 5) 腎血流量が改善するのはどの時期からか
- 6) cisplatin によるラジカルの発生機序について
- 7) cisplatin の抗癌作用の機序について
- 8) フリーラジカルスカベンジャーは cisplatin の抗癌作用も抑制するのではないか
- 9) この実験系で unmodified free SOD が効かなかった理由は
- 10) cisplatin は肝機能には影響は与えないか
- 11) 長時間経過後では尿中 NAG 排泄量の測定値はどうか
- 12) cisplatin の投与は Cu、Zn 及び Mg の尿中排泄量に影響を与えるか
- 13) DMTU とレシチン化 SOD の併用投与ではどうか

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 藤 田 公 生 副査 助教授 内 藤 恭 久