

## Cisplatin 腎障害に対する urinastatin の

## 予防効果に関する家兎実験

## —各種蛋白分解酵素阻害剤等との比較—

浜松医科大学産科婦人科学教室

小林 浩 大井 豪一 川島 吉良

Prevention of Cisplatin Induced Nephrotoxicity by Administering  
Urinastatin to Rabbits

## —Comparison with Other Protease Inhibitors—

Hiroshi KOBAYASHI, Hidekazu OHI and Yoshiro KAWASHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu

**概要** Urinastatin (US) による cisplatin (CDDP) の腎障害保護作用がいかなる薬理効果に基づくものか、すなわち、腎血流量保持作用が主体なのか腎尿細管保護作用によるものかを検討するため家兎を用いて以下の実験を行った。使用した薬剤は US(10,000U/kg, 3時間: 1群), メシル酸ガベキサート(2mg/kg/h, 4時間: 2群), アプロチニン(5,000U/kg/h, 4時間: 3群)および塩酸ドパミン(0.3mg/kg/h, 4時間: 4群)である。各群5匹ずつ用い輸液量は15ml/kg/hとし、最初の1時間は prehydration として5%ブドウ糖を、次の1時間は CDDP 3mg/kg を含んだ3%高張食塩水を、また、次の2時間は posthydration として0.9%生理的食塩水を点滴した。腎機能の指標として creatinine clearance (Ccr) 値, 尿中 arylamidase (AA) 活性, 尿中  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP) 活性の変化率を測定した。

## 1. CDDP 投与後の Ccr 値の変化

1, 2群においては Ccr 値の変化は認められなかったが, 3および4群では CDDP 投与1日目  $87.5 \pm 4.0$  および  $72.4 \pm 9.8$  と有意に低下した ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。

2. CDDP 投与後の尿中 AA 活性, 尿中  $\gamma$ -GTP 活性の変化

CDDP 投与1日目の2, 3, 4群の尿中 AA 活性は  $318 \pm 101$ ,  $486 \pm 116$ ,  $672 \pm 197$  であり1群にくらべて2, 3および4群が有意に高値を示したがいずれも一過性の上昇であった ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  および  $p < 0.001$ )。これに反し, 1群での尿中 AA 活性の変動はほとんど認められなかった。また, 尿中  $\gamma$ -GTP 活性の変動も尿中 AA 活性と類似した。

以上より, US の CDDP による腎障害抑制作用の主体は lysosome 酵素の細胞内流出に伴う各種酵素活性を US が阻害することにより腎尿細管細胞を保護することにあると推定された。

また, 今回使用した protease inhibitor のなかでは US が CDDP 腎障害保護作用として最良の薬剤であると思われる。

**Synopsis** The present study was performed to evaluate the mechanism of the protective effect of urinastatin (US) against cisplatin (CDDP) induced nephrotoxicity. We measured consecutively the change in the creatinine clearance (Ccr) level, urinary arylamidase (AA) activity, and urinary  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP) activity as the indices of nephrotoxicity. These drugs such as US (10,000U/kg, 3h: group 1), gabexate mesilate (2mg/kg/h, 4h: group 2), and aprotinin (5,000U/kg/h, 4h: group 3) as protease inhibitors, and dopamine HCl (0.3mg/kg/h, 4h: group 4) for the increase in renal blood flow were used with the hydration of 15ml/kg/h during 4 hours of experiments on rabbits.

The change in the Ccr value after the intravenous administration of CDDP indicated that the level in groups 3, 4 decreased significantly at one day after the administration of CDDP. On the other hand, there was little significant increase in urinary AA activity and/or urinary  $\gamma$ -GTP activity in group 1, while a transitional increase was observed in groups 2, 3, and 4, among which the highest level was found in group

4.

These results are attributed to the protective action of US against CDDP mainly in the inhibition of the lysosomal enzyme released by the destruction of lysosomes in the proximal tubule cells of the kidney.

**Key words:** Cisplatin・Nephrotoxicity・Urinastatin・Lysosome

### 緒 言

Urinastatin (商品名: ミラクリッド®, 持田製薬, 以下USと略す)は蛋白分解酵素, 糖・脂質分解酵素など, 種々の酵素を広範囲に阻害し, lysosome膜の安定化をもたらすため, CDDP腎障害を軽減する可能性が示唆され, 最近臨床応用されつつある<sup>1)3)</sup>. USによるCDDP腎障害抑制作用は腎血流保持と腎尿細管保護作用の両面が考えられるがいずれの機序が主体なのかは不明である.

現在, われわれはCDDPの腎毒性軽減<sup>9)10)</sup>のため, 3%高張食塩水の併用および輸液と強制利尿<sup>11)</sup>を施行しており, USを使用すればかなり輸液量を減少することが可能であることを家兎を用いた実験により確認した<sup>5)</sup>. そこで, 今回はUSによるCDDP腎障害抑制作用が主に腎血流量保持作用によるものか, あるいは, 腎尿細管保護作用によるものかを確認するため, US以外にメシル酸ガベキサート, アプロチニン, 塩酸ドパミン<sup>8)</sup>を使用してCDDP腎障害抑制効果を比較検討した.

なお, CDDPによる腎障害は主に近位尿細管細胞障害であるため, 近位尿細管細胞に存在する2種類の酵素活性, すなわち, 尿中 arylamidase(AA)活性,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)活性と creatinine clearance (Ccr) 値の変動をCDDPによる腎障害の指標として検討した<sup>4)</sup>.

### 実験方法

#### 1. 薬剤投与方法

平均体重3.1kgの日本白色種成熟雄家兎を実験に用い, 各群5匹ずつ以下の4群に分類した. 家兎は般橋農場株式会社製PM3固形飼料にて飼育し, 採血は耳静脈より行つた. CDDP投与中は家兎を固定し, 8Fr.バルーンを挿入して採尿し, 翌日からは採尿ゲージを用いた. いずれも輸液量は15 ml/kg/hの速さで4時間かけて輸液を行つた. 輸液方法はまず, prehydrationとして5%ブドウ糖15ml/kg/hを1時間かけて輸液し, 次の1時間は3%高張食塩水にCDDP 3mg/kgを混ぜたものを点滴し, 最後の2時間は0.9%生理的食塩水を15 ml/kg/hの速さで点滴静注した. 図1に各群の薬

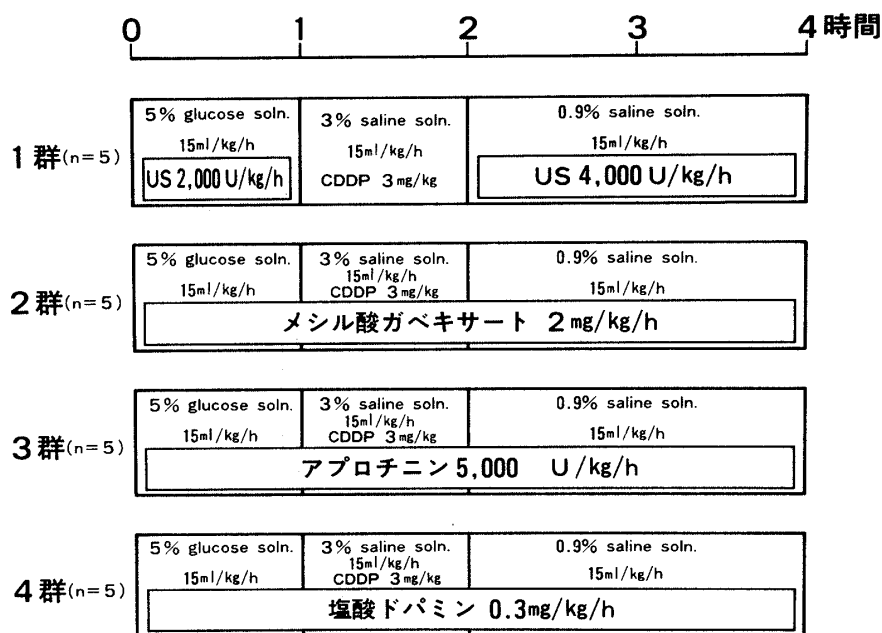


図1 薬剤投与方法

剤投与方法を示す。US は10,000U/kg(1群), メシル酸ガベキサート(商品名: FOY®, 小野薬品) は2mg/kg/h の速さで4時間(2群), アプロチニン(商品名: トラジロール®, バイエル) は5,000 U/kg/h の速さで4時間(3群), 塩酸ドパミン(商品名: イノバン®, 協和発酵) は0.3mg/kg/h の速さで4時間(4群)の輸液を行った。

## 2. 検査項目

Ccr 値(ml/min), 尿中 AA 活性(U/day), 尿中  $\gamma$ -GTP 活性(U/day) の3項目をCDDP 投与1, 2, 3, 7, 14日目に測定した。Ccr 値は(尿中 cr 値)  $\times$  (24時間尿量)/(血中 cr 値)により求めた。尿中 AA 活性は既報<sup>7)</sup>に従い, 尿中  $\gamma$ -GTP 活性は合成基質として L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide を用いた。CDDP 投与前の各群ごとに出した平均値を100として投与後の変化を百分率で示した。

3. 統計処理は t 検定により有意差検定を行った。

## 結 果

### 1. CDDP 投与後の Ccr 値の変化(図2)

CDDP 投与前値を100とした時の Ccr 値の変化を調べると, 1, 2群はCDDP 投与後14日目まではほとんど変化を認めなかったが, 3および4群のCDDP 投与1日目の Ccr 値の平均値 $\pm$ 標準偏差がそれぞれ,  $87.5 \pm 4.0$ ,  $72.4 \pm 9.8$ と1群と比

較して有意に低下した( $p < 0.05$ および $p < 0.01$ )。しかし, 4群でも2日目以降はCcr 値の回復を認め, 1週間以内にはほぼ投与前値に回復した。

### 2. CDDP 投与後の尿中 AA 活性の変化(図3)

既報<sup>5)</sup>と同様に1群, すなわち, US 併用群では尿中 AA 活性の変化はほとんど認めなかった。CDDP 投与1日目の2, 3, 4群の尿中 AA 活性はそれぞれ,  $318 \pm 101$ ,  $486 \pm 116$ ,  $672 \pm 197$ であり, 2, 3および4群が有意に( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ および $p < 0.001$ )高値を示した。2日目以降はい

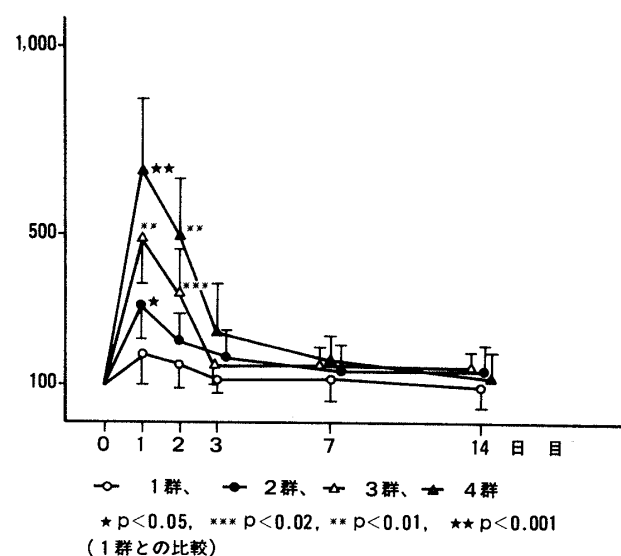


図3 尿中 AA 活性の変化

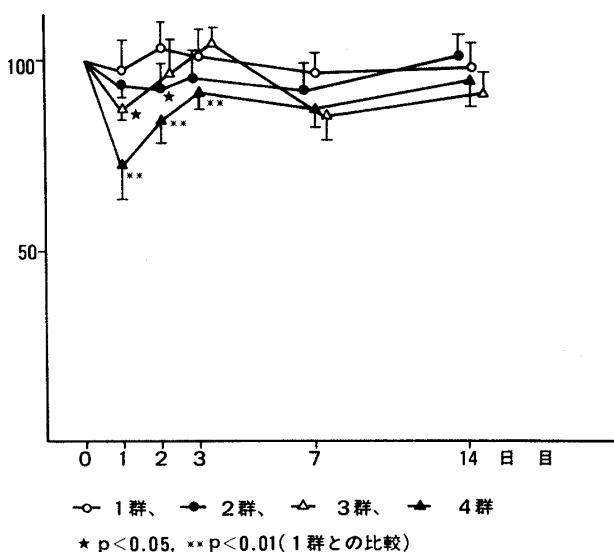


図2 Ccr 値の変化

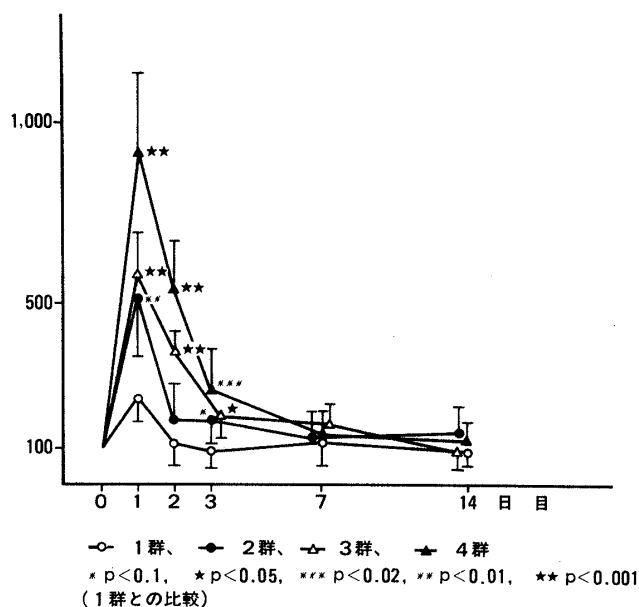


図4 尿中  $\gamma$ -GTP 活性の変化

ずれも漸減し、3日目にはほぼCDDP投与前値に復した。

### 3. CDDP投与後の尿中 $\gamma$ -GTP活性の変化(図4)

1群ではCDDP投与後1日目に尿中 $\gamma$ -GTP活性が軽度上昇( $237 \pm 63$ )したが2日目以降は投与前値に復した。一方、2, 3, 4群のCDDP投与1日目の尿中 $\gamma$ -GTP活性はそれぞれ、 $510 \pm 129$ ,  $579 \pm 129$ ,  $918 \pm 221$ であり、2, 3, 4群とも有意に(それぞれ、 $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ および $p < 0.001$ )高値を示したが、2日目以降はいずれも漸減し、CDDP投与7日目には投与前値に復した。

### 考 案

USはヒトの尿から分離・精製した分子量約67,000の糖蛋白質でトリプシン等の蛋白分解酵素のみならず、脂質分解酵素、多糖類分解酵素など種々の酵素を阻害する。そのほかlysosome膜安定化作用、lysosome酵素遊離抑制作用、心筋抑制因子(MDF)産生抑制作用などを有し、ショック時の循環動態を改善するため、急性肺炎や急性循環不全に対し臨床応用されている。すなわち、出血性ショックに伴う腎血流量低下抑制や術後尿細管機能を保護することが知られている<sup>6)</sup>。これらの薬理作用を考慮すると、CDDPによる腎毒性、すなわち、CDDPがlysosomeを破壊しlysosome酵素の細胞内流入による近位尿細管細胞破壊等を十分抑制し得る可能性が示唆される。

家兎を用いた実験<sup>9)</sup>により、CDDP投与時に200 ml/bodyの輸液のみでも3%高張食塩水とUS 10,000U/kgを使用することによりCDDPによる腎尿細管障害を完全に抑制することが可能であった。しかし、この腎保護作用がUSによる腎血流量増加のための2次的なものか、腎尿細管細胞のlysosome膜安定化作用、すなわち、各種酵素活性抑制作用によるものか不明である。もし、lysosome膜安定化作用が主体であれば、他のprotease inhibitorsでも同様にCDDPによる腎障害保護作用が確認されるはずである。そこで今回はメシル酸ガベキサート(FOY®)、アプロチニン(トラジロール®)および腎血流量増加作用のある塩酸ドパミン(イノバン®)を用いてUSとの比

較を行うことによりCDDP腎障害抑制機序を検討した。これらの薬剤以外にプロスタグランディンE<sub>1</sub>製剤にもlysosome膜安定化作用があるが、実際の臨床としてCDDPの腎保護作用のためには使用しにくい薬剤であるため今回の検討からは除外した。

既報<sup>9)</sup>に示すように、200ml/bodyおよび350ml/bodyの輸液を行ってもUS非併用の場合は尿中酵素排泄率が一過性に上昇した。塩酸ドパミンを $12 \mu\text{g/kg/分}$ 投与したイヌの実験<sup>8)</sup>ではカテコールアミンの効果が全面にでてしまい、腎血管収縮が起こり尿量が減少すると報告されているため、本実験での塩酸ドパミンの使用量を $0.3 \text{mg/kg/h}$ とした。今回、塩酸ドパミンを4時間かけて点滴静注しても尿中酵素排泄率を十分抑制することは不可能であった。すなわち、CDDP腎障害抑制にはhydrationによる腎血流量増加が必要であるが、臨床上使用可能な塩酸ドパミンの使用量では腎障害を完全に抑制することは不可能であった。腎障害軽減のためにイノバン®を使用した本田ら<sup>2)</sup>の報告によればイノバン®(使用濃度 $3 \mu\text{g/kg/分}$ )の腎毒性保護作用はラシックスとほぼ同等であるが、尿中 $\beta_2$ -microglobulin値の異常高値が40%に出現したとしている。

一方、メシル酸ガベキサート( $2 \text{mg/kg/h}$ )およびアプロチニン( $5,000 \text{U/kg/h}$ )による腎障害抑制効果はUSには及ばなかったが、Ccr値の変化はほとんど認められず、また、一過性であり、塩酸ドパミンよりいずれも良好な成績であった。メシル酸ガベキサートは非ペプチド系の蛋白分解酵素阻害薬で、トリプシン、カリクレインを阻害する以外に血液凝固系に対しても阻害作用を有し、トロンビンおよび活性型第X因子を阻害するとともに血小板凝集をも抑制する。また、アプロチニンはウシ肺から抽出した多価・蛋白分解酵素阻害物質(塩基性ポリペプチド)で血漿・血球および組織中の主要な蛋白分解酵素(キニノーゲン、トリプシン、キモトリプシン、線溶系酵素および一部の血液凝固因子)の作用を阻害する。

以上の結果から、USのCDDPによる腎障害抑制作用の本体は重金属であるCDDPが尿細管細

胞内の lysosome へ取り込まれ, lysosome の機能不全を起こし, lysosome 酵素の細胞内流出や細胞壊死を起こす過程で US やメシル酸ガベキサート, アプロチニンがこれらの各種酵素活性を抑制することにあると考えられた. Ccr 値の変化という clinical nephrotoxicity の面からはこれら 3 種の蛋白分解酵素阻害剤はいずれも有効であると判断されるが, 尿中 AA 活性や尿中  $\gamma$ -GTP 活性の変動という chemical nephrotoxicity の面からみると, メシル酸ガベキサートやアプロチニンより US の方が優れていると思われる. 実際の臨床では CDDP の投与は複数回くり返して行われるため chemical nephrotoxicity がいずれ clinical nephrotoxicity に移行し得る可能性がある. したがって, 今回使用した蛋白分解酵素阻害剤のなかでは US が最も CDDP 腎障害抑制のために有効な薬剤であるといえよう.

尿中酵素活性を測定したわれわれの成績では CDDP 投与 1 日目に尿中酵素排泄が増加し, 以後漸減したが, 電子顕微鏡による形態学的検討を行った小川ら<sup>7)</sup>の報告では, CDDP 投与 3 日目ごろより近位尿細管細胞に刷子縁の萎縮や消失, ミトコンドリアの濃縮・膨化・円形化およびクリステの板状から管状への変化, 基底ひだの不明瞭化などの変化があらわれ, 5 日目には刷子縁の消失, ミトコンドリアの空胞変性, 基底ひだの消失など変性が最も強くなり, 7 日目には再生像が認められるとしている. すなわち, lysosome 膜の破壊から細胞が変性壊死するまでには数日の lag time があるものと思われ, 尿中酵素活性測定は CDDP による腎障害の最も鋭敏な指標であり, chemical nephrotoxicity の有無も判断できる. 今後は US

の腎保護作用を形態学的に証明し, 実地臨床への応用を行う予定である.

#### 文 献

1. 原田信行, 鳥羽研二, 長瀬隆英, 松瀬 健, 山岡実, 丸茂一義, 本間請子, 福地義之助, 折茂 肇: 肺癌患者におけるシスプラチン腎障害に対する urinastatin の効果. 呼吸, 7: 484, 1988.
2. 本田 理, 秋谷 清: シスプラチン療法における腎障害軽減を目的としたドーパミン (イノパン®) 使用の検討. 基礎と臨床, 20: 416, 1986.
3. 井手 宏, 早川清一郎, 高橋 徹, 小林 昇: Cisplatin による腎障害に対してウリナスタチンが奏効した 1 例. 産婦の世界, 40: 859, 1988.
4. 小林 浩: 卵巣癌と Cisplatin—Cisplatin による腎障害の早期発見法—. 日産婦誌, 37: 888, 1985.
5. 小林 浩: Cisplatin 腎障害に対する urinastatin の予防効果—家兎を用いた実験から—. 日産婦誌, 41: 328, 1989.
6. 松田哲郎, 片岡 徹, 桜井俊宏, 竹元慎吾, 河村正敏, 幡谷 潔, 新井一成, 小池 正, 石井淳一: ウリナスタチンの術後腎機能に及ぼす影響. 薬理と治療, 15: 2171, 1987.
7. 小川隆嗣, 領家男, 浜田 駿: Cisplatin の腎毒性に対する fosfomycin の予防効果に関する形態学的観察. 日癌治, 23: 84, 1988.
8. 岡田和夫: ドパミン—基礎と臨床—(Conseiller, C. 編), 83, 協和醸酵, 東京, 1981.
9. Baffalo, N.Y.: A new method to prevent toxicity with high doses of cis diammine platinum. Asco. Abstracts, 17: 243, 1976.
10. James, J.S., Stephen, B.H. and Johanna, C.: Prevention of cisplatin nephrotoxicity. Clin. Res., 25: 243A, 1977.
11. Ward, J.M., Grabin, M.E., Berlin, E. and Young, D.M.: Prevention of renal failure in rats receiving cis-diamminedichloroplatinum (II) by administration of furosemide. Cancer Res., 37: 1238, 1977.

(No. 6547 平 1・2・7 受付)