

総説

## 白金系抗腫瘍薬シスプラチンによる腎傷害の動物種差に関する研究

片山 理恵子<sup>1, 2)</sup>, 永田 沙織<sup>2)</sup>, 飯田 紘子<sup>2)</sup>, 山岸 則夫<sup>1, 3)</sup>, 古濱 和久<sup>1, 2)</sup>

### 要約

白金系抗腫瘍薬シスプラチン (*cis*-diamminedichloroplatinum II) で誘発される腎傷害の発現機作を明らかにする目的で、その代謝に係わると考えられる腎皮質cysteine-S-conjugate  $\beta$  lyase (C-S lyase) に着目し、5種の動物を用いて、種差の観点から解析を試みた。まず、シスプラチンによる腎傷害へのC-S lyaseの関与を明らかにする目的で、感受性が高いと考えられたラットにC-S lyase阻害薬アミノオキシ酢酸 (AOAA) を前処置し、その後、シスプラチンを単回静注したところ、腎傷害は明確に軽減された。しかし、腎皮質白金 (Pt) 濃度には変化がみられなかったことから、本傷害にはシスプラチンの未変化体 (parent compound) よりむしろ、C-S lyaseにより代謝を受けた活性代謝物 (reactive metabolite) の関与が強く示唆された。次に、シスプラチンの最小腎傷害誘発用量を動物間で比較したところ、ラットおよびネコは高感受性、マウスおよびウサギは低感受性、イヌはその中間であることが判明した。これら感受性の違いはbasal腎C-S lyase活性の違いで説明された。したがって、腎に高濃度にPtが移行しても、腎C-S lyase活性が低いと必ずしも重篤な腎傷害発現に繋がらないことが明らかとなった。In vitro系において、各種動物の腎由来培養細胞を用いて、シスプラチンの細胞毒性 (cytotoxicity) を調べたところ、傷害性の強さはC-S lyase含量に依存していた。このことから、細胞系においてもシスプラチン腎傷害性とC-S lyaseの間に密接な関連があることが示唆された。以上、シスプラチンによる腎傷害には種差が存在し、その発現には腎へのPtの移行性と腎皮質C-S lyase活性が密接に関与していることが明らかとなった。

キーワード：シスプラチン，腎傷害，動物種差，C-S lyase

白金 (Pt) 製剤シスプラチンはヒト医療では肺がん、前立腺がんや卵巣腫瘍に幅広く使用された抗腫瘍薬であるが、その強い腎毒性のため現在では使用が制限されている [1, 2]。一方、獣医療では未だ有効な化学療法剤の一つであり、イヌの骨肉腫では第一選択薬として、扁平上皮がんや膀胱の移行上皮がんでは併用治療薬として、鼻腔内・口腔内腫瘍では放射線治療の増感剤として、骨肉腫やメラノーマではインプラントとして使用されている [3, 4]。投与経路としては通常静脈内投与であるが、中皮腫やがん性胸膜炎には胸腔・腹腔内投与が有効との報告もある [5]。

シスプラチン (図1) はPt原子を中心に2つのクロ-

ル原子とアンモニア分子が*cis*型に配位している [6] が、幾何異性にある*trans*型に配位した*transplatin*には活性はないと言われている [7]。作用機作として、標的腫瘍細胞に取り込まれたシスプラチンはaquation reactionにより2つのクロール基が水酸基に置換され、DNAの二重鎖に結合して架橋を形成する。同じDNA塩基に架橋を形成した場合はDNA adductと言い、異なったDNA塩基に形成した場合はDNA cross-linkと呼んでいる。シスプラチンは全てのDNA塩基と結合し、特にアデニンとグアニンに優先的に結合するため、90%以上はDNA adductを形成し、腫瘍細胞のDNA複製を阻害すると考えられている。一方では細胞周期

<sup>1)</sup> 岐阜大学大学院連合獣医学研究科

<sup>2)</sup> 岩大支会，岩手大学共同獣医学科基礎獣医学分野

<sup>3)</sup> 岩大支会，岩手大学共同獣医学科臨床獣医学分野

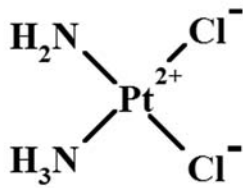


図1 シスプラチンの化学構造式  
分子量：300.05, 化学式：Cl<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Pt

に非特異性に作用するとの報告もある [5]. シスプラチンの血中挙動はイヌでは2相性で、半減期は第1相で22分、第2相で5日 [8], 尿中Ptレベルはシスプラチン静注後に直ちに上昇し、4時間以内に60%が、48時間以内で投与量の76%が尿から検出され、胆汁への排泄量はごく微量で [9], 腸管循環は少ないと考えられている.

有害作用に関しては、イヌでは腎毒性、悪心、急性嘔吐や骨髄抑制であり、ヒトで問題となる聴覚障害や神経障害は稀である [10]. 有害作用の中で、腎毒性は重篤で、用量制限因子となっている [5]. 病理組織学的には腎尿細管上皮細胞の変性・壊死が特徴的である. 病理発生としては、最初に近位尿細管のS3 segmentが障害され、用量（濃度）依存的に遠位尿細管や集合管にも障害がみられるという [11]. 反面、ネコでは、40mg/m<sup>2</sup>投与で腎うっ血とともに重篤な肺水腫および胸水による呼吸困難が頻発し、20mg/m<sup>2</sup>投与では有害作用は見られないものの抗腫瘍効果も得られないと報告され、使用禁忌となっている [12],

シスプラチンによる腎毒性の発現機作仮説としては、静注されたシスプラチンが肝臓に取り込まれ、glutathione S-transferaseによりグルタチオン抱合を受け (Pt-GSHを形成)、一部は腎糸球体で濾過 [13] されるが、大部分は漿膜側に存在するorganic cation transporters (OCT) 2を介して近位尿細管に取り込まれ、尿細管管腔に分泌される [14]. 分泌されたPt-GSHは近位尿細管刷子縁に存在するγ-glutamyltranspeptidase (GGT) やaminodi-peptidase (ADP) によりシステイン抱合を受け (cysteine-S-conjugateを形成) 極性が高まった結果、近位尿細管で再吸収される [15]. その後、上皮細胞内に存在するcysteine-S-conjugate β-lyase (以下C-S lyase) によりC-S結合が切断され反応性に富んだチオール化シスプラチン、すなわち活性代謝物 (反応性代謝物) が生成されるという [15]. このチオール化シスプラチンがフリーラジカルを生成してミトコンドリア膜を損傷した結果、Ca<sup>2+</sup>流入が亢進して細胞死を引き起こすと推察されている [16, 17]. この仮説に対する反論として、Wainfordら [18, 19] はマウスおよびラットにGGT阻害薬acivicinを腹腔内

前投与するとシスプラチン腎傷害は軽減されたが、ラットにC-S lyase阻害薬AOAAあるいはADP阻害薬bestatinやL-phenylalanyl-glycineを腹腔内前投与しても軽減が認められなかったという. したがって、GGTのみがシスプラチン腎傷害に関与する酵素であると結論している. 一方ではWainfordら [18, 19] の論文に対する反論として、近位尿細管刷子縁は障害初期に剥離・脱落し易く、また再生も遅いことから、重度なシスプラチン腎傷害の移行にGGTの関与は疑わしいとの意見もある.

このように、シスプラチン腎傷害の機作に関しては未だ不明なことが多いため、本研究では、シスプラチンの腎内代謝に重要な役割を担っていると考えられる腎皮質尿細管上皮内C-S lyaseに着目し、動物種差の観点から*in vivo*および*in vitro*系を用いて、臨床病理学的、薬物動態学および分子生物学的見地からアプローチした.

## 材料及び方法

### 使用薬物

シスプラチン (シスプラチン注®, マルコ製薬, 愛知) は市販のもの (0.5mg/mL濃度) をそのまま使用した. AOAA (アミノオキシ酢酸ヘミ塩酸塩®, 和光純薬工業, 大阪) はMilli-Q水 (以下MQ水) で1%になるように溶解した.

### 使用動物

実験には雄性BALB系マウス, 雄性Fischer344系ラット, 15週齢の雄性NZWウサギ (日本エスエルシー, 静岡), 1-3歳齢の雌雄日本ネコ (体重3.1±0.3kg, 白石実験動物飼育所, 東京) および2-3歳齢の雄性ビーグル犬 (体重12.5±0.8kg, 第一三共, 東京) を用いた. マウスは入荷当日に屠殺し, ラットおよびウサギは室温22±3℃, 湿度55±25%, 12時間明暗サイクル (午前8時点灯, 午後8時消灯) の条件下の実験動物飼育室で飼育した. 飼育期間中, マウスとラットにはマウス・ラット・ハムスター用固形飼料 (MEQ, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) を, ウサギにはウサギ・モルモット用固形飼料 (ラボRグロウ, 日本農産工業株式会社, 神奈川) を, ネコおよびイヌは, 室温22℃前後の動物飼育室で一定の照明サイクル条件下 (午前8時点灯, 午後6時消灯) で飼育し, 市販のフード (ノバルティス・アニマルヘルス, 東京) を1日2回給与した. 飲料水は水道水を自由摂取させた. 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認可とともに「岩手大学動物実験に関する指針」に従って実施した.

## 検討

### 1 ラットでのシスプラチン腎傷害に対するAOAAの防御効果

6週齢の雄性ラット (n=5) にシスプラチンの45 mg/m<sup>2</sup>を静脈内単回投与した (シスプラチン単独群)。AOAAはシスプラチン投与60分と30分前の2回強制経口投与した (シスプラチン+AOAA併用群)。Saline対照群には生理食塩水 (15mℓ/kg, 静脈内) とMQ水 (10mℓ/kg, 経口) を投与した。本実験ではシスプラチン投与日をDay 1とし, 5日間観察 (Day 5に屠殺) した, 使用した薬物の用量, 投与液量および投与条件は予試験を基に設定した。

Day 5にラットはエーテル麻酔下, 頸動脈より採血した。得られた血清を用いて尿素窒素 (UN) およびクレアチニン濃度をオートアナライザー (Accute TBA-40FR, 東芝メディカルシステムズ, 栃木) で測定した。屠殺後, 摘出した右腎は直ちに10%ホルマリンで固定後, 3 μmに薄切し, 定法に従いヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し鏡検した。近位尿細管上皮細胞の壊死スコアは, 変化なし (-), 軽微 (±), 軽度 (+), 中等度 (2+) および重度 (3+) とし, 鏡検はblind下で行い, その後peer reviewを受けた。

腎皮質Pt濃度は左腎皮質の0.1gを-30℃で凍結した後, 一昼夜かけて凍結乾燥し, 乾固物の重量を測定した。乾固物に濃硝酸1 mℓを添加し, 100℃のホットプレート上で可溶化し, さらに乾固した。これに1 M硝酸を加えて測定用サンプルとした。腎皮質Pt濃度は小型サイクロトロン (baby cyclotron) を用いたParticle Induced X-ray Emission (PIXE: 粒子線励起X線) 法により測定 (岩手医科大学仁科記念サイクロトロンセンター, 滝沢) した。PIXE法はサイクロトロンなどの加速器で試料に粒子線を照射し, 発生する元素固有のエネルギーを持つ特性X線を測定して元素を分析する方法である。単位はμg/g乾燥重量で表した。

### 2 各種健常動物での腎皮質C-S lyase活性

健常マウス, ラット, ウサギ, ネコおよびイヌから腎皮質を摘出し, そのミトコンドリア分画を下記手順に従って調整した。

#### 2-1 細胞分画

各腎皮質を約0.5g秤量し, 4倍量のhomogenize buffer [0.25 Mスクロースと10mM Tris-HCl (pH 7.5) をMQ水で希釈して作製] と1/10量のprotease inhibitor cocktail液 (Complete Mini, Roche Diagnostics, Germany, 1錠を1.5mℓのMQ水にて溶解) を加え, オートホモジナイザー (Polytron®, Kinematica AG,

Switzerland) を用いて懸濁後, 遠心して (600g, 10分間) 上清を得た。上清をさらに遠心 (6,000g, 20分間) 後, 得られた沈殿物に約1 mℓのhomogenize bufferを加えテフロンホモジナイザーで攪拌し, これをミトコンドリア分画とした。この分画を5-10分間ソニケーション (Bioruptor, コスモバイオ, 東京) 後, 遠心 (20,400g, 10分間) して, 得られた上清をマトリックス分画とした。全ての操作は4℃下で行い, 得られたサンプルはBCA-200 Protein Assay Kit (BCA法, Pierce, USA) でタンパク濃度を測定後, -80℃で保存した。

#### 2-2 Western blot解析

各動物から得たミトコンドリアマトリックス分画のタンパク量を, 20 μgになるように調整し, 電気泳動用ゲル (e-PAGEL®, 12.5%濃度, アトー株式会社, 東京) を用いて, 泳動後 (SDS-PAGE, 25mA, 60分間), 分離したタンパクを疎水性ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Immobilon™-P, Millipore, USA) に転写 (120mA, 60分間) した。転写した膜はブロッキングバッファー (Odyssey® Infrared Imaging System Blocking Buffer, Li-COR Biosciences, USA) で4℃一晚振盪させた。その後, マウス抗ヒト抗体GOT2 (H00002806-A01, Abnova, 台湾) をCan Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡, 大阪) を用いて500倍に希釈し1時間室温にて反応させた。0.05% Tween20加トリス緩衝液 (Tris-buffered saline with 0.05% Tween20: TBS-T) で洗浄後, Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2 (東洋紡) を用いて5000倍に希釈したIRDye680標識抗マウスIgG二次抗体 (Rockland Immunochemicals, USA) を室温, 遮光下にて1時間反応させた。TBS-Tにて洗浄後, 抗原抗体反応させたタンパクはOdyssey Infrared Imaging System (Odyssey® Infrared Imager, Li-COR Biosciences) を用いて検出・可視化した。なお, mitAspATのアミノ酸配列は動物種によって異なるが, 一部cross reactionがあるため同一性の確認は可能と考え, 本抗体を用いた。

#### 2-3 腎皮質mitAspAT活性の測定

ミトコンドリア分画におけるC-S lyase活性をアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (mitAspAT) 活性とみなし, Cooper and Meister [20] の方法に準じて測定をした。すなわち, 0.1 M Tris-HCl (pH8.8), 5 mM α-keto-γ-methylbutyrate (α-KGM, Sigma, USA) および 20mM L-phenylalanine (ナカライテスク株式会社, 京都) から成る反応基質 (各5 μℓ) にマトリックス分画をタンパク量として40 μgを加えて総量

が50 $\mu$ lとなるようにMQ水で調整し、37 $^{\circ}$ Cで30分間 incubateした。反応は1 M KOHの150 $\mu$ lを添加して停止させ、生成されたphenyl-pyruvateを吸光度OD 332nmで測定した。得られた吸光度はphenyl-pyruvateの分子吸光定数 (=16,000) から酵素活性を算出し nmol/min $\cdot$ mg proteinで表した。

### 3 各種動物での最小腎傷害誘発用量の推定

投与量はマウスでは22.5, 45および90mg/m<sup>2</sup>の3用量を、ラットでは11.3, 22.5, 45および90mg/m<sup>2</sup>の4用量を、ウサギではマウスおよびラットの結果を参考に、45mg/m<sup>2</sup>近傍を含むように12, 24, 48, 96および192mg/m<sup>2</sup>の5用量を設定した。対照群には シスプラチンの最大投与量と同量の生理食塩水を投与した。なお、ネコおよびイヌの腎傷害誘発用量は既報から引用できることから、投与実験は行わなかった。

Day 5にマウスおよびラットはエーテル麻酔下で腹大動脈あるいは頸動脈から、ウサギは耳静脈から採血し、上記と同様な方法で血清UNおよびクレアチニン濃度を測定し、近位尿細管上皮細胞の壊死のスコア化とともに腎皮質Pt濃度を定量した。

## 4 *In vitro* 細胞系でのC-S lyaseの発現とシスプラチンの細胞傷害性

### 4-1 培養細胞の調整

ラット腎臓由来細胞NRK (Normal rat kidney, RCB0043) およびウサギ腎臓由来細胞RK13 (Rabbit kidney13, RCB0183) は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研BRC (東京)より入手した。ラット用培地はイーグルMEM培地「ニッスイ」(日水製薬, 東京)をMQ水に溶解し、オートクレーブにより高圧蒸気滅菌をした後、7.5% NaHCO<sub>3</sub>, 3%グルタミン酸溶液およびfetal bovine serum (FBS) の50mlを添加した。これを10% FBS-minimum essential medium (MEM) とした。ウサギ用培地はMEMにNEAA (MEM Non-Essential Amino Acids 100x Solution) 10mM (GIBCO) を添加し、0.1mM NEAA含有10%FBS-MEMとした。ネコ腎臓由来細胞FKD (Feline kidney distal tubule cell) は本学応用生

物課程生化学研究室において、樹立されたものを用い、培地は5% FBS-MEMを使用した。イヌ腎臓由来細胞MDCK (Madin-Darby canine kidney) は本学応用生物課程生化学研究室が、理化学研究所から分与されたものを用いた。培地は10% FBS-MEMを使用した。なお、マウス腎臓由来細胞に関しては、樹立を試みたが、良好な系を確立できなかったため、本実験では上記4種培養細胞系のみで実験を行った。各培養細胞は37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で培養し、継代は0.1% Trypsinを用いて3-4日に1回行った。また、各細胞を実験に用いる際は、尿細管細胞はnon-dividing cellsであるため、confluent状態になったものを用いた。96-well plateに1 wellあたり1.0 $\times$ 10<sup>4</sup>個の細胞を播種し (Day 1), Day 4にconfluent状態にさせてから実験に使用した。

### 4-2 リアルタイムPCR

各細胞からRNAをAGPC (acid guanidium phenol chloroform) 法を用いて抽出し、逆転写反応を Oligo dT法 (Rever Tra Ace- $\alpha$ -TM, 東洋紡績, 大阪)で行った。リアルタイムPCRはSYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>II (Perfect Real Time, タカラバイオ, 東京)を用いた。検出したC-Slyaseの分子種はGOT2 (mitAspAT)であり [21], normalizerとしてGAPDHを用いた [22]. なお、本実験ではGOT2およびGAPDHのプライマーはラット用に設計 (表1)されたものを用いた。10倍希釈した逆転写反応液にSYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>II, 10pmol/ $\mu$ L PCR Forward Primerおよび10pmol/ $\mu$ L Reverse Primerを加え、滅菌MQ水で全量を25 $\mu$ Lにした。反応液調整後、スピンドウンし、サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System TP850, タカラバイオ)でrelative quantificationを行った。その後、GAPDHに対するGOT2の相対発現量を求めた。

### 4-3 シスプラチンによる細胞毒性

Confluent状態の細胞の培地を除去し、新たに1% FBS-MEM培地を100 $\mu$ l/well加えた。1% FBS-MEM培地で希釈したシスプラチンをincubate後添加して、3時間曝露させた。シスプラチンの濃度は予試験を基に各細胞がほぼ死滅する濃度を最高濃度に6段階に設

表1 リアルタイムPCRに使用したプライマー

Gene	Accession No.	Primer	Sequence	Position
GOT2	NM_013177	Forward	5'-TGCCAATCCTATGCCAAGAACA-3'	909-930
		Reverse	5'-CTTCTGCATCTTTGCAGACCACA-3'	965-984
GAPDH	NM_017008	Forward	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	242-263
		Reverse	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	364-384

定し、1濃度あたり6well用いた。すなわち、ラットでは50-400 $\mu$ M、ウサギでは25-400 $\mu$ M、ネコとイヌでは3.13-100 $\mu$ Mに設定した。曝露終了後、シスプラチン添加1%FBS-MEM培地を除去し、1%FBS-MEM培地を100 $\mu$ l/wellに加え、21時間incubateした。その後、WST-lassay (Cell Counting Kit, 同仁化学研究所, 熊本)で細胞計数を行い、コントロール群の生存率を100%として各シスプラチン濃度における生存率(%)を算出して50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた。

#### 統計解析

得られたデータは平均値 $\pm$ 標準偏差(SD)で表し、2群間の比較ではF検定による分散分析を用い、その後Studentのt検定を実施した。3群以上の場合は一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、有意差が認められた場合、Dunnnett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有意差があ

ると判定した。

#### 成績

##### 1 ラットにおけるシスプラチン腎傷害に対するAOAAの防御効果(表2)

シスプラチン単独群ではsaline対照群に比べ、血清クレアチニン濃度(3.03mg/dl)の有意な上昇、病理組織学的には近位尿細管上皮細胞の重度な壊死・脱落、刷子縁の消失、核濃縮および管腔内のタンパク円柱を認め(図2A)、1例の死亡がDay2に観察された。AOAAを前処置すると、死亡例はなく、血清クレアチニン濃度(1.04mg/dl)の有意な低下と上皮細胞の壊死の軽減が認められた(図2B)。なお、AOAA単独群では血液生化学的および病理組織学的に特記すべき所見は認められなかった。腎皮質Pt濃度はシスプラチン単独群(37.4 $\pm$ 12.5 $\mu$ g/g)とAOAA併用群(35.1 $\pm$ 5.8 $\mu$ g/g)の間に有意差は認められなかった。

表2 シスプラチンとAOAAを雄性ラットに併用投与後、Day5における臨床病理学的所見

投与群	用量	体重 <sup>b)</sup> (mg/kg)	死亡率	血清 クレアチニン (mg/dl)	腎近位尿細管上皮の 壊死スコア <sup>a)</sup>				腎皮質Pt 濃度 ( $\mu$ g/g)
					-	±	+	2+	
Control	Saline10mL/kg+DW10mL/kg	193.2 $\pm$ 12.6	0/5	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>b)</sup>	5 <sup>c)</sup>	0	0	0	BLQ
AOAA alone	Saline10mL/kg+AOAA100mg/kg	174.4 $\pm$ 7.5*	0/5	0.21 $\pm$ 0.01	5	0	0	0	BLQ
Cisplatin alone	Cisplatin45mg/m <sup>2</sup> +DW10mL/kg	139.8 $\pm$ 13.0**	1/5	3.03 $\pm$ 1.06*	0	0	0	4	74.9 $\pm$ 12.5
Cisplatin+AOAA	Cisplatin45mg/m <sup>2</sup> +AOAA100mg/kg	142.8 $\pm$ 6.1**	0/5	1.04 $\pm$ 0.20**†	0	1	4	0	70.2 $\pm$ 5.8

BLQ: below the limit of qualification, Saline: 0.9% physiological saline, DW: distilled water  
AOAA was orally administered 30 and 60 min before an intravenous injection of cisplatin.

<sup>a)</sup> Grade, -: no change;  $\pm$ : slight; +: mild; 2+: moderate

<sup>b)</sup> Values show the mean  $\pm$  SD.

<sup>c)</sup> Number of animals showing lesions

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control (Dunnnett's test), † $P < 0.01$  vs. cisplatin alone (Student's t-test)

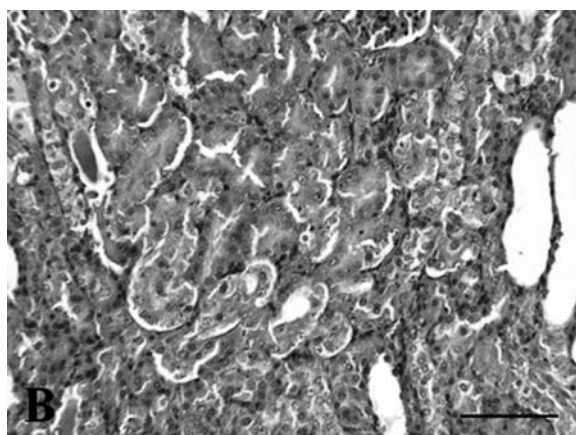
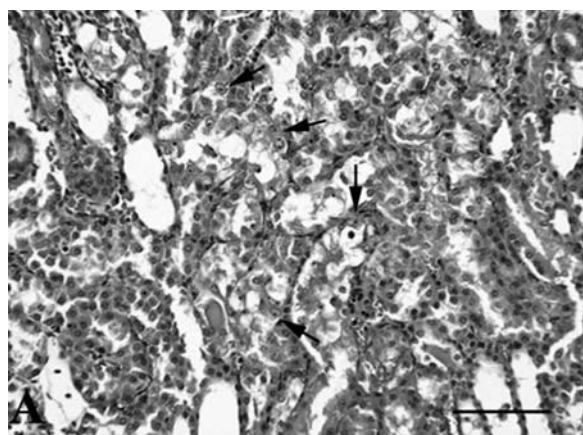


図2 シスプラチンとアミノオキシ酢酸(AOAA)を雄性ラットに併用投与後、Day5における腎組織像。A: シスプラチン(45mg/m<sup>2</sup>, iv)単独群, 広範な近位尿細管上皮の壊死と核濃縮を示す上皮(矢印)が観察された。B: シスプラチン(45mg/m<sup>2</sup>, iv)+AOAA(100mg/kg $\times$ 2, po)併用群, シスプラチン単独群の傷害が軽減されている。H-E staining, Bars=100 $\mu$ m

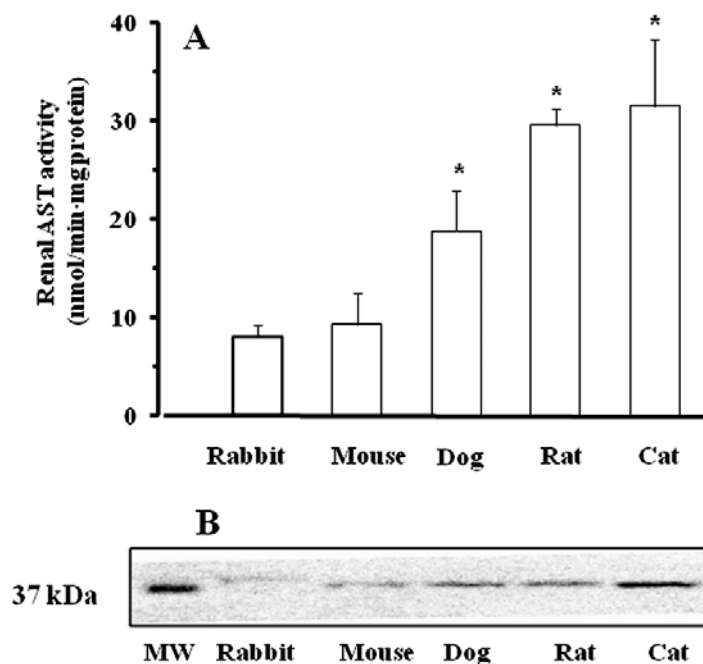


図3 健常マウス、ラット、ウサギ、ネコおよびイヌの腎皮質ミトコンドリア分画アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (mitAspAT) とWestern blot解析. A: mitAspAT活性,  $n=6$ ,  $*P<0.05$  vs. マウス mitAspAT (Dunnnettの多重比較検定). B: Western blot, マウス抗ヒト抗体 GOT2を使用, C-S lyaseは同一分子量37.1kDに存在する.

## 2 各種健常動物における腎皮質C-S lyase活性

### 2-1 Western blot解析 (図3B)

マウス、ラット、ウサギ、ネコおよびイヌの5種のnaive動物を用いて腎皮質におけるmitAspATタンパクの検出を抗体で行ったところ、全ての動物で分子量37.1kDa付近にバンドが検出された。したがって、これらの動物において腎皮質ミトコンドリアにC-S lyase活性を有する共通のタンパクが存在することが確認された。

### 2-2 腎皮質mitAspAT活性 (図3A)

5種のnaive動物を用いて腎皮質mitAspAT活性を測定したところ、マウス (9.2nmol/min·mg,  $n=5$ )、およびウサギ (8.0nmol/min·mg,  $n=6$ ) に比べ、ラット (29.5nmol/min·mg,  $n=5$ ,  $P<0.05$ ) およびネコ (31.4nmol/min·mg,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ) で有意に高い活性を示した。イヌはこれら4種の中では中間値であった (18.8nmol/min·mg,  $n=6$ ,  $P<0.05$  vs. マウス)。

## 3 各種動物における最小腎傷害誘発用量 (表3)

### 3-1 血液生化学検査

マウスでは45mg/m<sup>2</sup>群から血清クレアチニン (0.18 mg/dl) の上昇傾向がみられ、90mg/m<sup>2</sup>群では1例がDay2に状態が悪化し、切迫屠殺した。ラットでは22.5mg/m<sup>2</sup>群以上で血清クレアチニン濃度の有意な上昇 (0.56mg/dl) が認められ、90mg/m<sup>2</sup>群では全例死亡した。ウサギでは48mg/m<sup>2</sup>群以上で血清クレアチ

ニン濃度の有意な上昇 (9.44mg/dl) がみられ、192 mg/m<sup>2</sup>群では全例死亡した。なお、溶媒対照群では試験期間を通して異常症状は認められなかった。

### 3-2 腎病理組織学的所見

検討した3種動物間においては腎の形態学的変化は共通しており、近位尿細管上皮細胞の脱落・壊死、刷子縁の消失、管腔内のタンパク円柱、尿管管傷害に反応した再生性変化 (上皮細胞の巨核化) が特徴的であった。マウスでは45mg/m<sup>2</sup>群以上から軽微から軽度の近位尿細管の壊死 (スコア平均値: 0.4) がみられた。ラットでは22.5mg/m<sup>2</sup>群以上で中等度の近位尿細管の壊死、タンパク円柱および再生性変化が観察された。ウサギでは48mg/m<sup>2</sup>群で軽度から中等度の近位尿細管の壊死 (1.67) およびタンパク円柱が認められた。上記3-1の血液生化学検査結果と考え併せると、腎傷害誘発用量は、ウサギ48mg/m<sup>2</sup> ≒ マウス45mg/m<sup>2</sup> > ラット22.5mg/m<sup>2</sup>の順であり、ラットで腎傷害性が最も強かった。

### 3-3 腎皮質Pt濃度

マウス、ラットおよびウサギとも腎皮質Pt濃度は用量依存性に増加した。上記3-2の腎傷害誘発用量での腎皮質Pt濃度は、マウス16.0 μg/g、ラット26.8 μg/g およびウサギ81.7 μg/gであり、腎皮質Pt濃度は、ウサギ > ラット > マウスの順に高かった。

表3 シスプラチンを雄性マウス、ラットあるいはウサギに単回静脈内投与後、Day 5 における臨床病理学的所見

動物種	用量 (mg/m <sup>2</sup> )	体重 <sup>b)</sup>	死亡率	血清 クレアチニン (mg/dℓ)	腎近位尿細管上皮の 壊死スコア <sup>a)</sup>					腎皮質Pt濃度 (μg/g)
					-	±	+	2+	3+	
Mice	Control	20.5 ± 0.8	0/5	0.07 ± 0.01 <sup>c)</sup>	5 <sup>b)</sup>	0	0	0	0	BLQ
	22.5	19.7 ± 1.1	0/5	0.09 ± 0.07	5	0	0	0	0	10.5 ± 1.8
	45	16.5 ± 1.3**	0/5	0.18 ± 0.11	2	2	1	0	0	16.0 ± 5.1
	90	16.9 ± 0.9**	2/5	2.04 ± 0.72*	0	0	2	1	0	31.0 ± 4.7
Rats	Control	189.7 ± 7.6	0/5	0.23 ± 0.02	5	0	0	0	0	BLQ
	11.3	180.0 ± 5.3	0/5	0.23 ± 0.01	5	0	0	0	0	11.0 ± 4.8
	22.5	168.8 ± 9.9*	0/5	0.56 ± 0.15*	0	0	0	4 <sup>e)</sup>	0	26.8 ± 5.3
	45	144.4 ± 5.1**	0/5	2.39 ± 0.32*	0	0	1	4	0	60.0 ± 8.5
	90	ND	5/5	ND	0	0	0	1 <sup>f)</sup>	0	128.9
Rabbits	Control	2.70 ± 0.14	0/3	0.78 ± 0.03	3	0	0	0	0	BLQ
	12	2.68 ± 0.23	0/3	0.82 ± 0.05	3	0	0	0	0	19.8 <sup>g)</sup>
	24	2.69 ± 0.24	0/3	0.94 ± 0.06	3	0	0	0	0	31.1
	48	2.27 ± 0.18**	0/3	9.46 ± 1.03**	0	0	1	2	0	81.7
	96	2.00 ± 0.18**	0/3	14.10 ± 1.95**	0	0	0	1	2	176.2
	192	ND	2/2	ND						

BLQ: below the limit of qualification, ND: no data

<sup>a)</sup> Grade, -: no change; ±: slight; +: mild; 2+: moderate; 3+: severe

<sup>b)</sup> The unit of body weight is g for mice and rats, and kg for rabbits.

<sup>c)</sup> Values show the mean ± SD.

<sup>d)</sup> Number of animals showing lesions

<sup>e)</sup> One animal was excluded because of the technical error of the tissue preparation.

<sup>f)</sup> One moribund animal was included.

<sup>g)</sup> The number of animals was 2, because of accidentally technical errors. Values show the mean.

\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs. in each species (Dunnett's test)

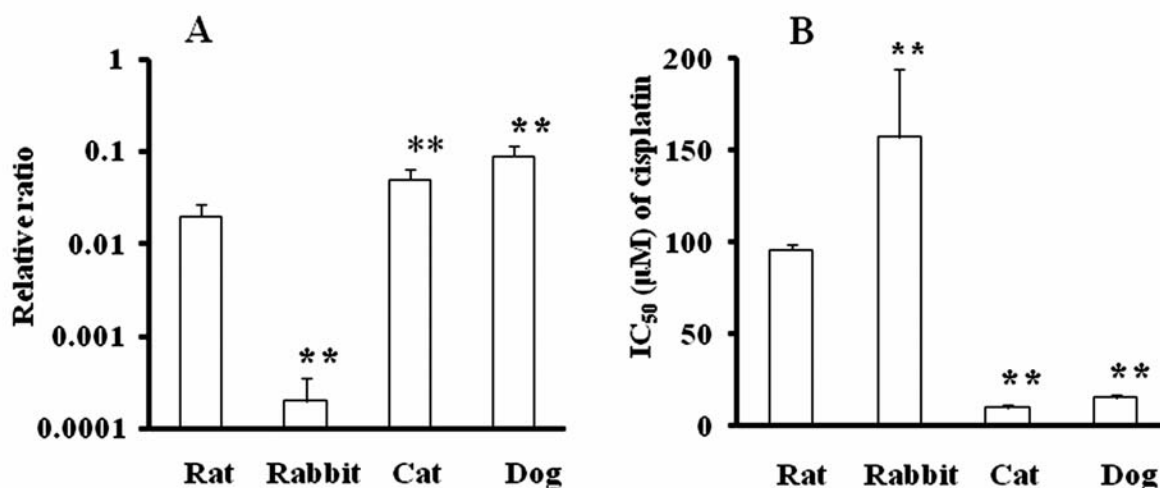


図4 ラット、ウサギ、ネコおよびイヌの腎由来培養細胞におけるC-S lyase mRNAの発現と細胞傷害性。A: リアルタイムPCRにおけるC-S lyase mRNAの相対発現。GAPDH mRNAで補正した(%)。B: 細胞傷害性のIC<sub>50</sub>値(5-6回の実験より求めた)、\*\**P* < 0.01 vs. ラットIC<sub>50</sub>値(Dunnettの多重比較)。

#### 4 In vitro細胞系でのC-S lyaseの発現とシスプラチンの細胞毒性

##### 4-1 リアルタイム PCR (図4A)

GAPDHをnormalizerとして相対定量を行ったmRNAレベルでの相対mitAspAT値はイヌ(1.0x10<sup>-1</sup>) > ネコ(4.6x10<sup>-2</sup>) > ラット(2.2x10<sup>-2</sup>) > ウサギ(2.2x10<sup>-4</sup>) の

順に高かった。また、ラットに対し、ウサギ、ネコおよびイヌにおいて有意差が認められた。

##### 4-2 シスプラチンによる細胞毒性 (図4B)

シスプラチンの3時間連続曝露におけるIC<sub>50</sub>値はウサギ(157.3 μM) > ラット(96.2 μM) > イヌ(15.5 μM) > ネコ(9.90 μM) の順に高かった。また、ラットに

対し、ウサギ、ネコおよびイヌにおいて有意差が見られた。したがって、細胞毒性はネコ>イヌ>ラット>ウサギの順に強かった。

### 考 察

哺乳類においてC-S lyase活性を有する酵素は、細胞質に6種、ミトコンドリアに4種、両方に共通する1種の計11種類存在することが、これまでの研究で判明している [23]。これら11種の酵素は、全てピリドキサルリン酸 (pyridoxal 5'-phosphate: PLP) を補酵素とし、アミノ酸の生合成に関与するアミノ基転移を触媒している。このため、殆どがアミノトランスフェラーゼ (AST) であると考えられている。本研究で取り上げたミトコンドリア分画アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (mitAspAT) は、細胞質由来AspAT (cytAspAT) やアラニンアミノトランスフェラーゼ (cytAlaAT) よりも腎における化合物代謝に深く係わり [24]、シスプラチン腎傷害においては、活性代謝物チオール化シスプラチンを生成し、ミトコンドリア障害を誘発すると考えられている [16, 17]。なお、血漿 (清) AspATは、細胞質およびミトコンドリア由来AST (GOT) を含有し、定型的な肝臓検査として繁用されている。

まず、シスプラチン腎傷害にC-S lyaseが関与することを確認するために、ラットにシスプラチンを単回静注したところ、著しい血清クレアチニン濃度の上昇と近位尿細管上皮細胞の重度の壊死が観察された (シスプラチン単独群)。これにC-S lyase阻害薬AOAAを前投与すると、単独群で見られた腎傷害を機能・形態学的に明らかに軽減した (AOAA併用群)。しかし、腎皮質Pt濃度にはシスプラチン単独群とAOAA併用群との間には有意差が認められなかった。マウスでの実験においても、AOAAを併用投与するとシスプラチン腎障害を防御するものの、腎皮質Pt濃度には差が認められなかったとの報告 [15] があり、本実験の結果とよく一致していた。これら結果を考え併せると、シスプラチン腎傷害は未変化体 (親化合物) によって引き起こされるのではなく、C-S lyaseによるbiotransformationにより生成された活性代謝物 (チオール化シスプラチン) の関与が強く支持された。なお、C-S lyase阻害薬AOAAはPLPの特異的アンタゴニストとして働き、PLP (ビタミンB<sub>6</sub>) は上述したようにAspATがアミノ基転移反応の際に必要な補酵素であり、環境汚染物質ハロゲン化アルケンによる腎毒性を *in vivo* および *in vitro* 系双方で抑制することも知られているが [25, 26]、中枢抑制作用を有することから医薬品としては開発されていない。

次に、5種類の健常動物を用いて、腎皮質ミトコンドリア (マトリクス) 分画におけるbasal C-S lyaseの発現をWestern blotで調べたところ、同一の分子量 (37.1kDa) においてタンパクが確認された (図3B)。また、これら腎皮質C-S lyase活性を定量的に測定したところ、ネコ>ラット>イヌ>マウス>ウサギの順に活性を示し、ネコはイヌより活性が高く、ウサギの活性が最も低かった (図3A)。したがって、腎皮質ミトコンドリアにおけるC-S lyase活性には動物種差があることが判明した。

上記成績を基に、種差の存在を確認するために、最小腎傷害誘発用量を、血清クレアチニン濃度と腎尿細管上皮の壊死を指標に調べたところ、ラットで22.5 mg/m<sup>2</sup>、マウス45mg/m<sup>2</sup>、ウサギ48mg/m<sup>2</sup>であった。既文献によると、イヌでの腎傷害用量は40mg/m<sup>2</sup>、ネコでは強い肺水腫を併発するものの40mg/m<sup>2</sup>以下と推測されている [12]。これらデータを考え併せると、ラットおよびネコは高感受性、マウスおよびウサギはそれより低く、イヌはその中間であると考えられた。一方、腎傷害誘発用量での腎皮質Pt濃度はウサギ>ラット>マウスの順に高く、上述の腎傷害誘発性 (ラット>マウス≒ウサギ) とは乖離が認められた。そこで、腎傷害誘発性、腎皮質Pt濃度および腎C-S lyase活性の3つの因子を考慮に入れると、マウスでは腎へのシスプラチン (すなわちPt) の移行が少なく、かつ活性代謝物 (チオール化シスプラチン) 生成に関与する腎C-S lyase活性も低いことから腎傷害が惹起され難かったと考えられた。ラットでは腎にシスプラチンが移行し易く、かつ腎C-S lyase活性が高いことから強い腎傷害が誘発されたと推測された。一方、ウサギでは腎に高濃度のシスプラチンが移行するものの、腎C-S lyase活性が低いことから重篤な腎傷害発現に繋がらなかったと考えられた。

前述したようにシスプラチン腎傷害における発現機作に関しては、Haniganら [16, 17] とWainfordら [18, 19] の間には考え方に大きな違いがある。本研究での動物種差のデータを基にすると、Haniganら [16, 17] の仮説を一部支持するものであった。すなわち、近位尿細管で再吸収されたcysteine-S-conjugateが上皮細胞内に存在するC-S lyaseによりC-S結合が切断され、反応性に富んだ活性代謝物チオール化シスプラチンが生成されるという仮説である。しかし、最終的な検証には、チオール化シスプラチンの定量化が必須であり、このことは今後の課題として残っている。

*In vitro* 系において、シスプラチンの細胞毒性と細胞C-S lyase活性との間に関連があるか調べるために、4種の腎由来培養細胞を用いて検討した。検討に先立



ち、mitAspATの塩基配列は各動物によって異なり、動物種間の正確な定量比較は難しいと考えられたため、比較的相同性のある位置で新たにプライマーを設計した。本プライマーを用いて、リアルタイムPCRで各培養細胞のbasal C-S lyaseの相対発現（GAPDHを補正した相対定量）を比較したところ、ネコとイヌで発現量が高く、次いでラット、そしてウサギの順であった。次に、シスプラチンの細胞毒性の評価に先立ち、Ptを用いてglutathione S-transferaseおよびcysteine-S-conjugateの作成を試みたが、目的とする生成物は得られなかった。そこで、予めFBSとPtを結合させ、4種培養細胞に対するシスプラチンの細胞毒性をIC<sub>50</sub>値で比較したところ、ネコ=イヌ>ラット>ウサギの順に強い細胞毒性がみられ、上記basal C-S lyase発現量の順位に類似していた。このことから、*in vitro*系においてもbasal C-S lyase活性とシスプラチン細胞傷害性には関連性がみられ、C-S lyaseの発現量が細胞毒性に関与していることが一部示唆された。

以上より、抗腫瘍薬シスプラチンによる腎傷害には種差が存在し、その発現には腎へのPtの移行性とともに関与していることが*in vivo*および*in vitro*系で明らかとなった。今後、これらの知見がシスプラチンの有害作用を軽減し、安全性の高いC-S lyase阻害薬の開発に繋がることを期待している。

なお、本研究の一部はKatayama R, Nagata S, Iida H, Yamagishi N, Yamashita T, Furuhashi K: Possible role of cysteine-S-conjugate  $\beta$ -lyase in species differences in cisplatin nephrotoxicity. Food Chem. Toxicol. 49, 2053-2059 (2011) に掲載されていますので、興味のある方は参照して頂ければ幸いです。

## 謝 辞

本研究にあたり、多大なご支援・ご指導を賜りました岩手大学共同獣医学科生産獣医療学教室 佐藤繁教授に深謝します。また、研究にご協力頂いた小動物外科学教室 片山泰章先生、応用生物化学課程 山下哲郎先生および河合成重教授に心より感謝の意を表します。

## 引用文献

[1] Giaccone G: Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 59, 9-17 (2000)

[2] Lokich J, Anderson N: Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol*, 9, 13-21 (1998)

[3] Vail DM, Kurzman ID, Glawe PC, O'Brien MG, Chun R, Garrett LD, Obradovich JE, Fred

RM 3rd, Khanna C, Colbern GT, Working PK: STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, 50, 131-136 (2002)

- [4] Kitchell BE, Brown DM, Luck EE, Woods LL, Orenberg EK, Bloch DA: Intralesional implant for treatment of primary oral malignant melanoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 204, 229-236 (1994)
- [5] Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C: Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Com Oncol*, 6, 1-18 (2008)
- [6] Page R, Matus RE, Leifer CE, Loar A: Cisplatin, a new antineoplastic drug in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc*, 186, 288-290 (1985)
- [7] Chikuma M, Sato T, Komeda S: Current status and future perspectives of platinum antitumor drugs. *Yakugaku Zasshi*, 128, 307-316 (2008)
- [8] Jacobs C, Kalman SM, Tretton M, Weiner MW: Renal handling of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Treat Rep*, 64, 1223-1226 (1980)
- [9] Litterst CL, Gram TE, Dedrick RL, Leroy AF, Guarino AM: Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875) to dogs. *Cancer Res*, 36, 2340-2344 (1976)
- [10] Lana SE: Chemotherapy. In: Dobson, J. M. and Lascelles, D. X. [eds] *Manual of Canine and Feline Oncology*, 2<sup>nd</sup> ed. New LLL Publisher, (2003)
- [11] Choudhury D, Ahmed Z: Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2, 80-91 (2006)
- [12] Knapp DW, Richardson RC, DeNicola DB, Long GG, Blevins WE: Cisplatin toxicity in cats. *J Vet Intern Med*, 1, 29-35 (1987)
- [13] Hanigan MH, Devarajan P: Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*, 1, 47-61 (2003)
- [14] Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H: Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic

- cation transport. *Kidney Int*, 66, 196-202 (2004)
- [15] Townsend DM, Hanigan MH: Inhibition of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate  $\beta$ -lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 142-148 (2002)
- [16] Zhang L, Cooper AJL, Krasnikov BF, Xu H, Bubber P, Pinto JT, Gibson GE, Hanigan MH: Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria in vivo and with selective inactivation of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells. *Biochemistry*, 45, 8959-8971 (2006)
- [17] Hanigan MH, Townsend DM, Cooper AJL: Letter to the editor. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin. *Toxicology*, 257, 174-175 (2009)
- [18] Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM: Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology*, 249, 184-193 (2008)
- [19] Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM: Letter to the editor. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin. *Toxicology*, 257, 176-177 (2009)
- [20] Cooper AJL, Meister A: Glutamine transaminase K from rat kidney. *Methods Enzymol*, 113, 344-349 (1985)
- [21] Cooper AJL, Bruschi SA, Anders MW: Toxic, halogenated cysteine S-conjugates and targeting of mitochondrial enzymes of energy metabolism. *Biochem Pharmacol*, 64, 553-564 (2002)
- [22] Huang Q, Dunn RT 2nd, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, Stoll RE, Blanchard KT: Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci*, 63, 196-207 (2001)
- [23] Cooper AJL, Pinto JT: Cysteine S-conjugate  $\beta$ -lyase. *Amino Acids*, 30, 1-15 (2006)
- [24] Cooper AJL, Bruschi SA, Iriarte A, Martinez-Carrion M: Mitochondrial aspartate aminotransferase catalyses cysteine S-conjugate  $\beta$ -lyase reactions. *Biochem J*, 368, 253-261 (2002)
- [25] Elfarra AA, Jakobson I, Anders MW: Mechanism of S-(1,2-dichlorovinyl) glutathione-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 35, 283-288 (1986)
- [26] Finkelstein MB, Baggs RB, Anders MW: Nephrotoxicity of the glutathione and cysteine conjugates of 2-bromo-2-chloro-1,1-difluoroethene. *J Pharmacol Exp Ther*, 261, 1248-1252 (1992)

## 文 献 抄 録

### パスツレラ・マルトシダと関連したカラス呼吸器疾患の集団発生に関する調査

Strugnell BW, Dagleish MP, Bayne CW, Brown M, Ainsworth HL, Nicholas RAJ, Wood A and Hodgson JC  
(英国獣医学研究所, 英国)  
*Avian Pathol*, 40, 329-336 (2011)

カラスの疾病や大量死の可能性のある原因について、2007年8月から2008年3月の間にイングランド北部の野外養豚場付近で調査された。生存捕獲され呼吸器症状を呈していた5羽、生存捕獲され呼吸器症状がみられない1羽、死亡個体12羽で構成される9羽のハシボソガラスと9羽のミヤマガラスが検索された。臨床症状、肉眼的、病理組織学的検査、微

生物学、毒性学は、パスツレラ・マルトシダ感染が疾患の原因であることを示唆していた。生存捕獲され呼吸器症状を呈していた個体からパスツレラ・マルトシダが分離され、分子および血清型分析では、菌体抗原型は3, 4, 7を示し、全ての分離株の荚膜抗原型はF型であった。免疫組織化学は検査の診断的精度を高め、生存捕獲された全ての個体と死亡個体12羽中10羽の肺病変内にパスツレラ・マルトシダが検出された。これらの所見は、イギリスにおける野生のカラスは、パスツレラ・マルトシダに関連した肺疾患に罹患できること、さらにパスツレラ・マルトシダの潜在的なベクターとして家禽に対して危険性があることを示唆している。

(岩手大学獣医病理学研究室)