

称号及び氏名	博士(獣医学)	岡本 茉里
学位授与の日付	2022年3月31日	
論文名	犬におけるシスプラチン投与による腎障害とその予防に関する研究	
論文審査委員	主査	秋吉 秀保
	副査	笹井 和美
	副査	桑村 充
	副査	西田 英高

論文要旨

緒言

シスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum:CDDP)は、1969年に B. Rosenberg らによって発見された物質である。1983年には日本において抗癌剤として認可を受け、人臨床での使用が開始された。現在、人医療では、膀胱癌、頭頸部癌、骨肉腫などさまざまな固形腫瘍に対する化学療法の中心的薬剤として、広く使用されている。一方で、CDDPには、他の抗癌剤と同様に骨髄抑制、腎障害などの副作用が報告されている。特に、腎障害は、癌患者においては、高齢者が多数を占め、潜在的に腎機能が低下していることが多いために、治療の際に大きな障害となってきた。CDDPの腎毒性について、人医療では、腎臓の中でも主に近位尿細管が標的となること、および蓄積性かつ用量依存的に強い細胞毒性が発揮されることが明らかにされている。CDDPによる腎障害の発生機序の解明を受け、抗癌作用を損なうことなく腎障害を軽減する方法が検討され、癌の種類や発生部位によって、利尿を促進することで腎臓内でのCDDP濃度を低下させるとともに早期の排泄を促す方法、あるいはCDDPを中和する薬剤との併用など様々な方法が臨床応用されるに至り、現在の幅広い使用につながっている。

一方、犬では、1990年代に膀胱癌(移行上皮癌)に対してCDDPの高い有効性が報告されたと同時に、CDDPの副作用として、人と同程度の腎障害が生じることが臨床例を用いた研究によって報告されている。前述のように、人では

腎障害を軽減する方法を併用することで CDDP を中心とした化学療法が、膀胱癌に対して行われている一方で、現在、犬の膀胱癌に対する臨床においては、人とは異なり CDDP はほとんど使用されていない。強い抗癌作用をもつ CDDP が犬の臨床で使用されていない背景として、獣医療では CDDP が犬に臨床応用された当初の使用経験に基づいた、腎障害が発生するという事実のみがクローズアップされたために、犬における CDDP の腎毒性について詳細な解析を進めることなく、多くの臨床医が、膀胱癌以外の癌腫への適応も含めて、犬の癌治療において CDDP の使用を敬遠することとなった可能性が考慮される。現在、犬の癌治療において、有効性が認められる抗癌剤の種類は少ないことから、抗癌作用が証明されている CDDP の使用について再検討することは、獣医臨床分野において大きな意義があると考えられる。

本研究では、世界的に解析が進んでいない犬の CDDP による腎障害についてより詳細に解析した上で、腎障害を軽減する薬剤との併用投与法を開発することを目的として、第 1 章では、臨床的用量の CDDP を投与した犬における腎臓に関連する臨床病理学的パラメータを経時的に解析するとともに、腎臓の組織学的解析を行った。さらに、第 2 章では、CDDP と併用することで腎毒性を軽減しうる薬剤としてチオ硫酸ナトリウム (sodium thiosulfate : STS) を選択し、STS の犬での安全性を評価するとともに、CDDP と併用投与した際の腎臓に関連する臨床病理学的パラメータおよび腎臓組織像への影響について評価した。

第 1 章 CDDP 投与による犬の腎障害について

前述の様に、犬における CDDP の腎毒性について詳細な解析が行われていないことから、臨床現場で実際に使用されている投与量の CDDP による腎障害を臨床病理学的および病理組織学的に評価した。

第 1 節 臨床病理学的パラメータの解析

健常ビーグル犬 4 頭に、 70 mg/m^2 の CDDP を投与し、血液および尿を投与前、6、12、24、72 および 168 時間後に採取した。血液では、BUN、CRE、Ca、IP、Mg、Na、K および Cl を測定し、尿では、UPC、UAC、NAG 指数および L-FABP 指数をそれぞれ解析した。さらに、尿を SDS-PAGE で分離後、Coomassie Brilliant Blue 染色し、尿中蛋白質の泳動パターンを確認した。統計学的解析は、薬剤投与前を対照群として Dunnett の多重比較検定を使用し、 $P < 0.05$ を有意とした。

その結果、CRE は、CDDP 投与前と比較して、投与 168 時間後に有意に増加した ($P < 0.05$)。糸球体または尿細管障害のバイオマーカーである UPC は、投与前と比較して投与 72 時間後に有意に増加した ($P < 0.05$)。尿の蛋白電気泳動では、投与前と比較して投与 6 時間後から 72 時間後にかけてアルブミン (Alb) の増加が認められたとともに、投与前には確認されなかった Alb よりも低分子量の蛋白が CDDP 投与直後から観察された。さらに、近位尿細管障害のバイオマーカーである L-FABP 指数および NAG 指数は、投与前と比較して、それぞれ投与 72 時間後ならびに投与 24 および 72 時間後において、有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。これらの結果から、CDDP 投与後 72 時間後までに、犬におい

ても人と同様に近位尿細管をはじめとする尿細管障害が生じることが推測された。

第2節 腎臓の病理組織学的解析

臨床病理学的な評価の結果、CDDPの投与後72時間までに尿細管障害生じることが推測されたことから、CDDP投与72時間後の腎臓の病理組織学的解析を実施した。さらに、近位尿細管障害が発生した後の組織学的な変化の推移を確認するために168時間後の病理組織学的解析を実施した。健常ビーグル犬2頭において、CDDP投与72および168時間後に腎臓を採材し、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)または4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で固定後、切片を作製し、過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色、過ヨウ素酸メセナミン銀染色およびマッソントリクローム染色を実施した。さらに、近位尿細管、遠位尿細管、アポトーシスおよびマクロファージについて、それぞれのマーカーを用いて免疫組織化学的解析を実施した。

その結果、CDDP投与72時間後において近位尿細管にアポトーシス像が観察された。また、168時間後には、遠位尿細管の拡張や尿細管内円柱の形成および拡張した尿細管周囲の間質には活性化マクロファージの浸潤が多数観察された。これらの結果より、CDDP投与72時間後における近位尿細管障害が形態学的にも確認されたとともに、人と異なり、犬では168時間後に遠位尿細管にも障害が発生する事が明らかとなった。犬でもCDDPによる近位尿細管障害が確認されたことから、人医療で実施されているCDDP投与による腎障害の軽減法が犬にも応用できることが示唆された一方で、人では主体ではない遠位尿細管障害も犬では認められたため、人医療における腎障害の軽減法が遠位尿細管障害にも効果を発揮するかどうか検証する必要があると考えられた。

第2章 犬におけるSTSを用いたCDDP腎障害の予防

本研究では人医療で使用されているCDDPによる腎障害の軽減法のうちSTSの併用投与を選択した。STS由来のチオ硫酸イオンは、金属への強い配位性を示す事が知られており、人医療では、CDDPに含まれる白金と錯体を形成する性質を利用して、CDDPの中和薬としてSTSが用いられている。人臨床においては、CDDPを癌の栄養動脈から投与(動注)後、静脈からSTSを全身に投与することで、CDDPを高濃度で癌に曝露させるとともに、全身への副作用の発現を抑える方法が実施されている。本研究では、犬の癌に対するCDDPの動注療法とSTSの静脈内投与を併用したCDDPによる腎障害の軽減法を臨床応用するにあたり基礎的な知見を提供するため、STSの犬での安全性を評価した上で、STSのCDDPによる腎障害の軽減効果について検証した。

第1節 STS投与による生体への影響

健常ビーグル犬8頭を用いて、STS(9.8 g/m²)または生理食塩水をそれぞれ静脈内投与し、STS投与の安全性について評価した。血液および尿を薬剤投与前、6、12、24、72および168時間後に採取した。血液では、RBC、HGB、HCT、WBC、PLT、Na、K、Cl、Ca、IP、Mg、BUNおよびCREを測定した。また、尿

では、UPC を測定した。STS 投与は、生理食塩水投与と比較して、すべての評価項目において有意な変化が認められないことから、犬における STS の安全性が高いことが確認された。

第 2 節 STS 投与による CDDP 腎障害の予防

健常ビーグル犬 3 頭への CDDP 投与時に STS を併用投与した場合の腎障害の程度を臨床病理学的パラメータの変動を指標として評価した。血液および尿を、CDDP 投与前、6、12、24、72 および 168 時間後に採取し、CRE、UPC、NAG 指数および L-FABP 指数について、CDDP と STS 併用投与の結果を第 1 章にて解析した CDDP 投与と比較検討するとともに、尿中蛋白質の泳動パターンを確認した。その結果、CDDP 投与と比較して CDDP と STS 併用投与では、CRE、UPC および L-FABP 指数において有意に減少を示した ($P < 0.05$) ものの、NAG 指数において有意な変化は認められなかった。また、尿の蛋白電気泳動において尿中蛋白の増加は認められなかった。以上より、CDDP 投与時に STS を併用投与することは、CDDP 投与による尿細管障害が軽減される可能性が示唆された。

第 3 節 STS 投与による腎臓の病理組織学的解析

第 1 節または第 2 節で用いた STS または CDDP と STS 併用投与 168 時間後に、腎臓を採材し、10 % NBF または 4 % PFA で固定後、切片を作製し、PAS 染色および免疫組織化学法を実施し、第 1 章第 2 節にて解析した CDDP 単独投与 168 時間後と比較検討した。CDDP と STS 併用投与による腎臓の形態学的変化は、STS 投与と同程度であり、遠位尿細管の拡張や尿細管内円柱の形成が認められたものの、CDDP 投与と比較すると減少することが明らかとなった。以上の結果より、CDDP 投与に STS を併用投与することで、CDDP 投与による近位および遠位尿細管障害の軽減が可能となることが示唆された。

総括

犬では、臨床現場で実際に使用されている投与量の CDDP 投与によって、近位尿細管をはじめとする尿細管の障害を示唆する尿中蛋白の増加が認められ、腎臓の病理組織学的解析からは、近位尿細管および遠位尿細管の拡張や炎症細胞の浸潤などが観察された。人では、CDDP は近位尿細管障害が主体であるが、犬では、CDDP によって近位尿細管に加えて遠位尿細管も障害されることが明らかとなった。

CDDP による犬の腎障害の予防法として、CDDP と STS の併用投与は、臨床病理学的パラメータおよび腎臓の病理組織学的な解析から、CDDP 投与時に認められた腎障害を、安全に軽減可能であることが明らかとなった。

審査結果の要旨

シスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum:CDDP)は、1969年にB. Rosenbergらによって発見された物質であり、現在、人医療では、膀胱癌、頭頸部癌、骨肉腫などさまざまな固形腫瘍に対する化学療法の中心的薬剤として広く使用されている。CDDPには、他の抗癌剤と同様に骨髄抑制、腎障害などの副作用があり、なかでも、腎障害は、癌患者においては、潜在的に腎機能が低下していることが多いために、治療の際に大きな障害となっている。CDDPの腎毒性について、人医療では、腎臓の中でも主に近位尿細管が標的となること、および蓄積性かつ用量依存的に強い細胞毒性が発揮されることが明らかになってきたため、抗癌作用を損なうことなく腎障害を軽減する方法が検討され、癌の種類や発生部位によって、利尿を促進することで腎臓内でのCDDP濃度を低下させるとともに早期の排泄を促す方法、あるいはCDDPを中和する薬剤との併用など有効な方法が臨床応用されるに至り、現在、CDDPは人の癌治療に幅広く使用されている。

一方、犬では、1990年代に膀胱癌(移行上皮癌)に対してCDDPの高い有効性が報告されたと同時に、CDDPの副作用として、腎障害が生じることが臨床例を用いた研究によって報告されている。前述のように、人では腎障害を軽減する方法を併用することでCDDPを中心とした化学療法が、膀胱癌に対して行われている一方で、現在、犬の膀胱癌に対する臨床においては、人とは異なりCDDPはほとんど使用されていない。強い抗癌作用をもつCDDPが犬の臨床で使用されていない背景として、獣医療ではCDDPが犬に臨床応用された当初の使用経験に基づく、腎障害が発生するという事実のみがクローズアップされたために、犬におけるCDDPの腎毒性について詳細な解析を進めることなく、また、腎障害の軽減方法についても検討されないまま、多くの臨床医が犬の癌治療においてCDDPの使用を敬遠することとなった可能性が考慮される。

そこで、本研究では、世界的に解析が進んでいない犬のCDDPによる腎障害について明らかにするとともに、CDDPによる腎障害の軽減法を探索することを目的として、CDDP投与後の腎臓に関する臨床病理学的パラメーターの変化と腎臓の形態学的に評価した後、チオ硫酸ナトリウム(sodium thiosulfate:STS)とCDDPの併用投与による、CDDPの腎障害軽減効果について検討した。

第1章では、臨床的投与量のCDDPによる腎障害を臨床病理学および病理組織学的に評価した。その結果、CDDP投与後から尿細管障害のバイオマーカーの増加が認められた。さらに、近位尿細管障害のバイオマーカーは72時間後までに増加することが明らかとなった。これらの結果から、CDDP投与72時間後までに、犬においても人と同様に近位尿細管障害をはじめとする尿細管障害が生じることが推測された。腎臓の病理組織学的解析からは、CDDP投与72時間後において近位尿細管にアポトーシス像や遠位尿細管の拡張および尿細管内

円柱の形成が多数観察された。以上のことから、CDDP 投与 72 時間後における近位尿細管障害が形態学的にも確認されたとともに、人と異なり、犬では遠位尿細管にも障害が発生する事を明らかになった。

第 2 章では、人臨床においては、CDDP を癌の栄養動脈から投与（動注）後、静脈から STS を全身に投与することで、CDDP を高濃度で癌に曝露させるとともに、全身への副作用の発現を抑える方法が実施されている。本研究では、犬の癌に対する CDDP の動注療法と STS の静脈内投与を併用した CDDP による腎障害の軽減法を臨床応用するにあたり基礎的な知見を提供するため、STS の犬での安全性を評価した上で、STS の CDDP による腎障害の軽減効果について、第 1 章の CDDP 投与時と比較検討することで検証した。その結果、STS 投与は、生理食塩水投与と比較して、すべての評価項目において有意な変化が認められなかったことから、犬における STS の安全性が高いことが確認された。さらに、CDDP 投与時に STS を併用投与した場合の腎障害について、臨床病理学的パラメータを評価した結果、CDDP 投与と比較して CDDP と STS 併用投与では、尿細管障害のバイオマーカーにおいて減少を示した。CDDP と STS 併用投与による腎臓の形態学的変化は、STS 投与と同程度であり、遠位尿細管の拡張や尿細管内円柱の形成が認められたものの、CDDP 投与と比較すると減少することが明らかとなった。以上の結果より、CDDP 投与に STS を併用投与することで、CDDP 投与による近位および遠位尿細管障害の軽減が可能となることが示唆された。

本研究は、犬の臨床現場で実際に使用されている投与量の CDDP による腎障害について、人と同様に近位尿細管生じるとともに、犬では人とは異なり遠位尿細管障害も生じることを明らかとした。さらに、CDDP と STS の併用投与を用いることで、効果的に CDDP による腎障害を軽減できる可能性を示した。これらの研究成果は犬の癌治療および臨床獣医学に大きく貢献するとともに、新たな展開に資するものであるため、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。