

## 緒 言

2017 年の厚生労働省の調査では、悪性新生物受症患者の総数は、1,782 万人と推計され胃 (11.0%), 気管, 気管支および肺 (9.5%) が上位を占めている [1]. シスプラチン (CDDP, cis-diammine dichloroplatinum) は、これらのがんに対する化学療法に広く用いられている白金製剤であり、がん細胞内 DNA のグアニン, アデニンなどのプリン塩基と結合し、架橋を形成することで DNA の複製と転写を抑制して、抗腫瘍効果を示す.

1970 年代初頭, 米国国立癌研究所 (NCI, National Cancer Institute) で CDDP の臨床試験が開始されたが, 腎毒性, 骨髄抑制, 消化管毒性, 神経毒性などの多くの有害事象が出現したため, 開発の中断が余儀なくされた. 中でも腎毒性は極めて高頻度に出現する重篤な有害事象であった [2]. 事実, Latcha ら [3] は, CDDP を投与された患者 777 人のうち, 245 人 (31.5%) が急性腎障害 (AKI, acute kidney injury) を発症したと報告している. 以後, 腎毒性を軽減するために様々な投与レジメンが考案された. Cvitkovic ら [4] は, CDDP の投与前後に大量の補液と強制利尿を行うことで AKI が回避できることを見出した. この発見により, 臨床試験の再開が可能となり, 安全性および有効性に関する知見が集積され, 1978 年にカナダ, 米国およびイタリアで, 1983 年には我が国でも薬事承認された.

腎障害の一般的な予防方法として, 我が国のインタビューフォーム [5] には, 2.5 L 以上の輸液を 10 時間以上かけて投与し, CDDP 投与中には必要に応じて利尿薬を追加するように記載されている. しかし, Jongh ら [6] は, 高用量 CDDP ( $70\sim 85\text{ mg/m}^2$ ) による治療を受けた患者 400 人のうち 41% は補液を行っても, 血清クレアチニン値が上昇したと報告している. 大量補液の他に, 1.6 L の輸液を約 4 時間かけて補液するショートハイドレーション法の有効性も報告されている [7]. Horinouchi ら [8] は, 肺がん患者に対して行われたショートハイドレーションは有効であると結論しているが, 全身状態を表す performance status が 0 または 1 であることや, クレアチンクリアランスが  $60\text{ mL/min}$  以上であることが条件であり, すべての患者に当てはまるか否かは, 明らかではない. また, CDDP 誘発性の AKI から不可逆的な慢性尿細管症や腎線維化が起き, 慢性腎障害 (CKD, chronic kidney disease) に進展することも報告されている [9-10]. このように, CDDP による腎障害の予防方法は十分には確立できていないのが現状であり, 腎毒性は現在も CDDP の用量規定因子となっている.

CDDP が腎障害を誘発する原因としては, 尿細管上皮細胞に集積した CDDP が近位尿細管上皮細胞からシトクロム C の遊離を促進し, カスパーゼ 9 を活性化させること [11], 内皮機能障害と血管収縮による直接的な尿細管上皮細胞毒性, これらにより生じる腎血流量の減少 [12, 13] などが報告されているが, 詳細な

機序は未解明である。

一方、降圧薬の服用や血圧の低下が AKI の発症リスクを増大させるという報告がある。Arora ら [14] はレニン-アンジオテンシン系 (RAS, renin angiotensin system) 阻害薬を使用している心臓手術後の患者では、AKI 発症リスクが 27.6% 増加したことを報告している。また、RAS 阻害薬を使用している敗血症患者では、AKI の発症リスクが約 2 倍になることも報告されている [15-16]。その一方、Molinas ら [17] は、ロサルタンの前投与が虚血性 AKI に対して腎保護作用を示すこと、Brar ら [18] は、AKI 患者に対する RAS 阻害薬の使用は総死亡率を減少させることを報告しており、CDDP と RAS 阻害薬の併用が AKI に与える影響についても一定の見解は得られていない。さらに、使用する RAS 阻害薬によっても AKI に与える影響が異なる可能性もある。厚生労働省の令和元年国民健康・栄養調査および平成 29 年度患者調査で、収縮期血圧が 140 mmHg 以上の割合は、男性 36.2%、女性 24.9%であり、高血圧症の患者数は 994 万人と推定されている。また、高血圧症の受療率は人口 10 万人対比で 515 であり、同じ生活習慣病である脂質異常症の 117 や糖尿病の 177 を大きく上回っている。我が国の高血圧治療ガイドラインでは、薬物治療としてカルシウムチャネル拮抗薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、利尿薬が推奨されており [19]、CDDP がこのような降圧薬と併用されることは多い。その場合、CDDP 誘発性の腎障害がさらに増悪することは容易に想像できる。CDDP の効果は濃度依存的であり、腎障害のために用量を下げるのが余儀なくされると、必然的に治療強度が低下する。従って、腎障害の発症機序の解明や発症予防を目的とした投与レジメンの開発には、強い臨床的要請がある。

本研究では、CDDP 誘発性の腎障害によって CDDP の治療強度を低下させることがない化学療法レジメンの検討に資することを目的として、1) 臨床研究として降圧薬と CDDP 併用患者の腎機能障害の実態を調査した。また、その結果に基づき、リバーストランスレーショナルに、2) 降圧薬と CDDP との併用が CDDP 誘発性の AKI に与える影響、および 3) 降圧薬と CDDP との併用が CDDP 誘発性の CKD に与える影響についてマウスを用いた動物実験で調べた。以下、本研究で得られた結果を 3 章に渡って論述する。

## 略号

AKI	acute kidney injury
AML	amlodipine
AT1R	angiotensin II type 1 receptor
AT2R	angiotensin II type 2 receptor
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
BUN	blood urea nitrogen
CCB	calcium channel blocker
CDDP	cis-diammine dichloroplatinum
CKD	chronic kidney disease
CRE	creatinine
eGFR	estimated glomerular filtration rate
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ENA	enalapril
LOS	losartan
RAS	renin angiotensin system
OATP1B1	organic anion transporting polypeptides 1B1
OCT2	organic cation transporter type2
PBS	phosphate-buffered saline
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activating receptor gamma
sBP	systolic blood pressure
TEL	telmisartan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling

## 第1章 降圧薬とCDDP併用患者の腎機能障害の実態

### 1.1. 背景・目的

緒言に記述したように、降圧薬の併用や血圧の低下がCDDPによるAKIの発症リスクを増大させることが報告されている。降圧薬の中でもレニン-アンジオテンシン系(RAS)阻害薬の使用が関連していることが報告されている。例えば、小牧ら[20]は、血圧の低下とRAS阻害薬の併用が、CDDPを含む化学療法レジメンで治療された患者のCDDP誘発腎毒性を増悪させる可能性があることを報告している。一方、RAS阻害薬の一つであるロサルタン(LOS, losartan)はCDDPによる腎機能障害を抑制するという報告もある[21]。このように、RAS阻害薬を含め、降圧薬がCDDPの腎機能障害に与える影響について、統一的な見解は得られていない。また、腎障害を増悪させる降圧薬も特定されていない。

本章では、ヒトを対象とした臨床研究、即ち、CDDPによる化学療法レジメンで治療を受けた患者の診療情報を用いた後ろ向き観察研究により、以下のことを確認した。

- 1) CDDPと降圧薬の併用でCDDPによる腎機能障害が増悪するか否か。
- 2) 増悪するとすれば、腎障害を生じさせやすい降圧薬を特定できるか。

### 1.2. 方法

#### 1.2.1. 対象患者

2013年4月1日から2018年3月31日の間、独立行政法人国立病院機構大阪南医療センターでCDDPが投与された20歳以上の患者を対象とした。被験者登録にあたり、次の除外基準を設けた。

- 1) CDDPの1回標準投与量が50 mg/m<sup>2</sup>未満のレジメンで治療された患者
- 2) 過去にCDDPの投与歴のある患者
- 3) CDDPの投与間隔が2週間未満である患者

#### 1.2.2. 研究デザイン

後ろ向き観察研究(既存資料のみを用いた観察研究)とし、電子カルテを用いて対象患者を抽出、登録し、次の項目についての情報を収集、解析した。

- 1) 患者背景(年齢、性別、身長、体重、基礎疾患、治療歴など)
- 2) 治療開始日、治療終了日および治療終了理由
- 3) 副作用(悪心嘔吐、下痢、骨髄抑制など)
- 4) 降圧薬の併用の有無と併用された降圧薬の種類
- 5) その他使用中薬剤など
- 6) 血清クレアチニン(CRE, creatinine)、血液尿素窒素(BUN, blood urea nitrogen)および推定糸球体濾過量(eGFR, estimated glomerular filtration rate)

### 1.2.3. 解析方法

対象患者 (n=57) のうち除外基準に抵触しなかった患者 (n=38) を CDDP に降圧薬を併用していた群 (降圧薬併用群, n=13) と併用していなかった群 (降圧薬非併用群, n=25) に分け, それぞれの腎機能マーカーを比較した. 2 群間の平均値の比較には, Mann-Whitney *U* 検定を用いた. 頻度の比較にはカイ二乗検定を用い, 期待度数が 5 以下である場合はフィッシャーの直接確率検定を用いた. なお, 主要評価項目は CDDP 投与後の腎機能障害の有無とし, CRE および/または BUN が基準値の 1.5 倍を上回った場合を「腎機能障害あり」と定義した [20, 22].

### 1.2.4. 倫理的配慮

本研究は, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (文部科学省・厚生労働省) [23] に基づいて実施した. 研究に先立ち, 独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター倫理審査委員会の承認を受けた (受付番号: 30-67).

なお, 本研究は既存資料を用いた患者対応表を有しない匿名化による後ろ向き調査であり, インフォームド・コンセントを受ける代わりに, 当該研究の実施について, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針第 12 の 4 ①~⑥に定められた事項を研究対象者等に公開し, 研究対象者等が拒否できる機会 (オプトアウト) を保証した.

## 1.3. 結果

### 1.3.1. 患者背景

降圧薬併用群と非併用群の患者背景を比較した (表 1). eGFR はそれぞれ,  $71.5 \pm 14.3$  および  $84.4 \pm 20.4$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> で差はあるものの, 男女比 (男性/女性) は併用群で 7/6, 非併用群で 18/7, 年齢はそれぞれ  $69.8 \pm 10.0$  歳および  $64.4 \pm 8.8$  歳, CDDP の平均投与量はそれぞれ 99.6 mg/body および 98.2 mg/body, 治療開始前 (baseline) の CRE は併用群, 非併用群とも  $0.7 \pm 0.2$  mg/dL, BUN はそれぞれ  $15.9 \pm 6.0$  および  $14.2 \pm 3.7$  mg/dL であり, 両群間で同等であった. 併用されていた他の化学療法薬についても, ペメトレキセドが非併用群で用いられていたことを除いて両群間で同等であった. なお, 全ての症例で生理食塩液の補液による腎障害の予防対策が CDDP 投与前後に講じられていた. なお, CDDP に併用されていた降圧薬を表 2 に示した.

表 1 対象患者の治療開始前の腎機能マーカーおよび併用された化学療法薬

Characteristic	All patient (n=38)	Antihypertensive drug (+) (n=13)	Antihypertensive drug (-) (n=25)
Age (year)	66.2 ± 9.5	69.8 ± 10.0	64.4 ± 8.8
Sex (male/female)	25/13	7/6	18/7
CDDP (mg/body)	96.6 ± 17.8	93.2 ± 21.5	98.2 ± 15.8
CRE (mg/dL)	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2
BUN (mg/dL)	14.8 ± 4.6	15.9 ± 6.0	14.2 ± 3.7
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	80.0 ± 19.4	71.5 ± 14.3	84.4 ± 20.4
Cancer types			
Gastrointestinal	16	5	11
Lung	11	5	6
Lymphomas	6	2	4
Others	5	1	4
Combined anticancer drugs			
Tegafur gimeracil oteracil potassium	14	6	8
Irinotecan	6	2	4
Capecitabine	5	1	4
Trastuzumab	6	1	5
Rituximab	5	2	3
Gemcitabine	9	3	6
Dexamethasone	6	2	4
Pemetrexed	2	0	2
Vinorelbine	2	1	1

表 2 降圧薬併用群で併用された降圧薬

Antihypertensive drug	n=13
Telmisartan	2
Azilsartan	1
Enalapril	1
Telmisartan + Amlodipine	1
Olmesartan + Amlodipine	1
Valsartan + Azelnidipine	1
Amlodipine	3
Diltiazem + Azosemide	1
Bisoprolol	1
Spironolactone	1

### 1.3.2. 各コース終了後の腎機能マーカーの比較

治療前および治療第1～4コース終了時の腎機能マーカー（CRE, BUN および eGFR）の平均値の変動を図1に示した。併用群, 非併用群のいずれにおいてもCREとBUNは治療前（baseline）の1.5倍は超えず, 腎機能障害は観察されなかった。また, 全ての項目で併用群と非併用群の間に有意な差は見られなかった。両群に共通した変動として, CRE および BUN はコースを経るに従って上昇し, eGFR は低下していた。

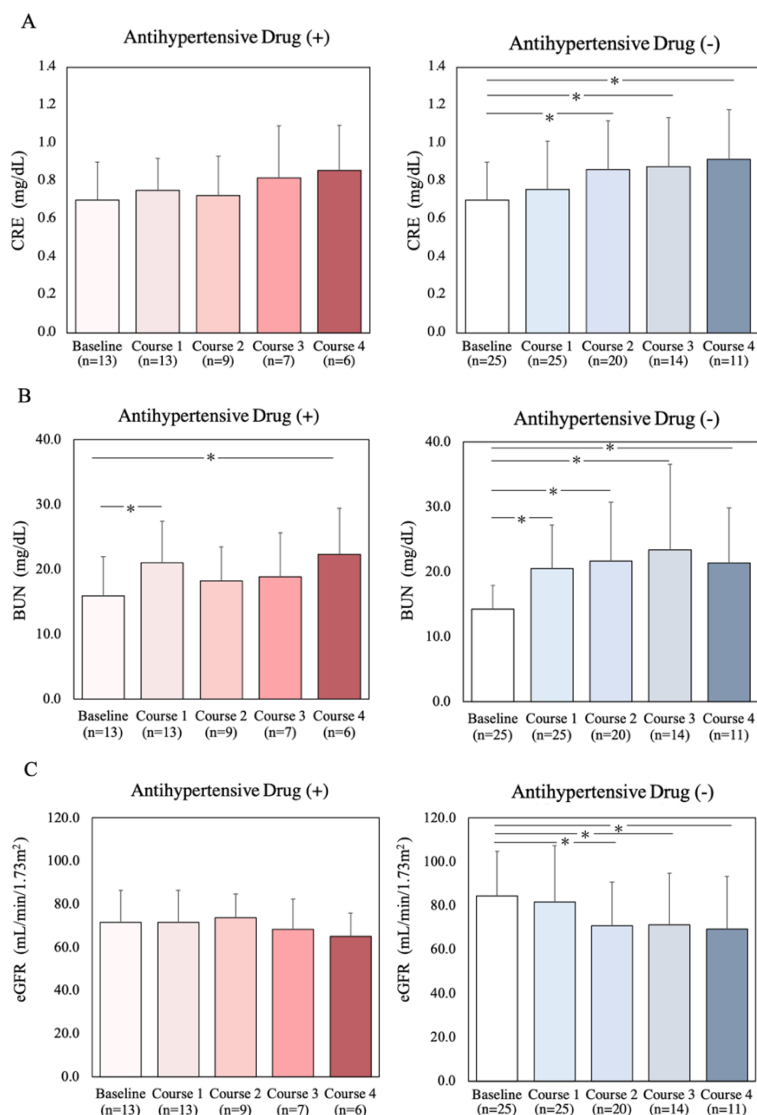


図1 降圧薬併用群および降圧薬非併用群の腎機能マーカーの推移

対象患者 (n=38) を降圧薬併用群 (n=13) および降圧薬非併用群 (n=25) に分け, 治療前 (baseline) および各コース終了時の腎機能マーカーの平均値+標準偏差 (SD) を算出した。 (A) 血清クレアチニン (CRE), (B) 血液尿素窒素 (BUN) および (C) 推定糸球体濾過量 (eGFR)。なお, baseline と各コース間の統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした。

### 1.3.3. 腎障害発症率の比較

CDDP 投与後の CRE および BUN の変動から腎障害の発症件数を調べ、CDDP の総投与回数に対する割合として併用群と非併用群の腎障害発症率を比較した。CDDP の総投与回数は併用群で 41 回 ( $3.3 \pm 1.7$  回/例)、非併用群で 83 回 ( $3.2 \pm 2.2$  回/例) であり、症例ごとの投与回数は同程度であった。腎障害発症率は、併用群で 14.6% (6 回/41 回)、非併用群で 13.3% (11 回/83 回) であった。このように、併用群の腎障害の発症率は非併用群よりもわずかに高いものの、両群間で有意な差は見られなかった。

本章 1.3.2. および 1.3.3. の結果から、一般論として降圧薬を併用することが、CDDP による腎毒性を増悪させる可能性は否定された。

### 1.3.4. RAS 阻害薬と CDDP との併用が腎機能マーカーに与える影響

前項で示した腎障害が見られた併用群の 6 回 (6 例) の服用降圧薬は、アムロジピン (AML, amlodipine) 1 例、テルミサルタン (TEL, telmisartan) 3 例、AML+オルメサルタン 2 例であり、6 例の中 5 例 (83.3%) で RAS 阻害薬が使用されていた。このことから、CDDP と降圧薬が併用される場合、特に RAS 阻害薬の併用が CDDP による腎障害を悪化させる原因である可能性が示された。RAS 阻害薬の併用と腎障害の関連性を確認するため、使用降圧薬の内訳を調査し (表 2)、併用群を RAS 阻害薬併用群と非 RAS 阻害薬併用群に分け、図 1 と同様に腎機能マーカー (CRE, BUN および eGFR) の変動を調べた (図 2)。なお、RAS 阻害薬併用群の内訳は、ARB 単独服用が 3 例 (TEL 2 例、アジルサルタン 1 例)、ACE 阻害薬単独服用が 1 例 (エナラプリル (ENA, enalapril))、ARB とカルシウムチャンネル拮抗薬 (CCB, calcium channel blocker) の併用が 3 例 (TEL+AML 1 例、オルメサルタン+AML 1 例、バルサルタン+アゼルニジピン 1 例) であり、非 RAS 阻害薬併用群の内訳は、CCB (AML) 単独が 3 例、CCB と利尿薬の併用が 1 例 (ジルチアゼム+アゾセミド)、 $\beta$  受容体遮断薬 (ビソプロロール) 単独服用が 1 例、利尿薬 (スピロノラクトン) 単独服用が 1 例であった。

第 4 コース終了時、RAS 阻害薬併用群では投与前 (baseline) と比較して、CRE と BUN の上昇および eGFR の低下が認められた。一方、非 RAS 阻害薬併用群では、baseline と比較して、CRE および BUN の増加と eGFR の低下は見られなかった。以上より、CDDP の腎毒性は、RAS 阻害薬の併用によって増悪する可能性が示された。



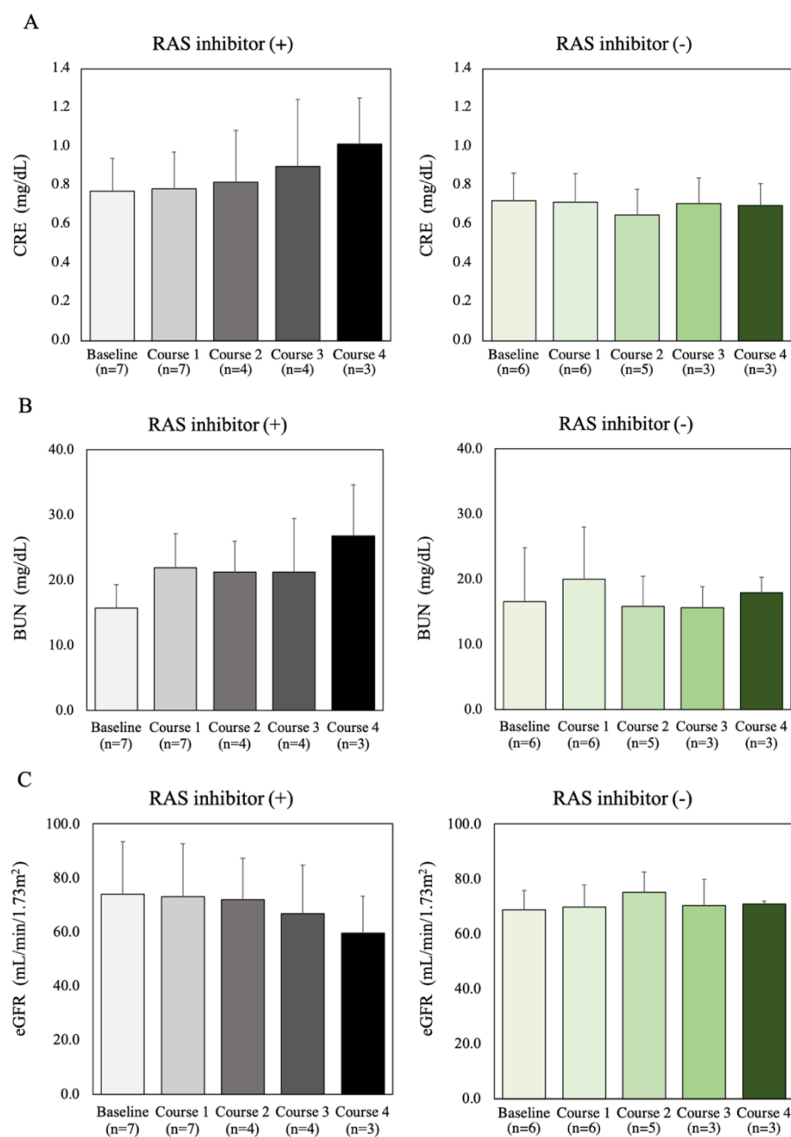


図2 RAS阻害薬併用群と非RAS阻害薬併用群の腎機能マーカーの推移

降圧薬併用群 (n=13) をRAS阻害薬併用群 (n=7) および非RAS阻害薬併用群 (n=6) に分け、治療前 (baseline) および各コース終了時の腎機能マーカーの平均値+標準偏差 (SD) を算出した。(A) 血清クレアチニン (CRE), (B) 血液尿素窒素 (BUN) および (C) 推定糸球体濾過量 (eGFR)。

### 1.3.5. RAS 阻害薬併用患者における腎障害発症率の比較

前項の結果から、併用した降圧薬のうち RAS 阻害薬が CDDP の腎毒性に影響を与える可能性が示された。RAS 阻害薬とその他の降圧薬で腎障害の発症率が異なるか否かを本章 1.3.3. と同様の方法で比較した。CDDP の総投与回数は RAS 阻害薬併用群で 20 回、非 RAS 阻害薬併用群で 21 回であった。そのうち腎障害が認められたのは、前者で 5 回 (25.0%)、後方で 1 回 (4.8%) であった。このことから RAS 阻害薬併用群は非 RAS 阻害薬併用群と比較して腎障害が発生する割合が高くなることが示された (表 3)。

表 3 RAS 阻害薬併用群および非 RAS 阻害薬併用群の腎障害の発症率

	Total course	Kidney injury
RAS inhibitor (+)	20	5(25 %)
RAS inhibitor (-)	21	1(4.8 %)

### 1.3.6. RAS 阻害薬の併用により腎機能低下が認められた 1 例

以上の結果から、CDDP による治療中に RAS 阻害薬を併用すると、他の降圧薬を併用した場合と比較して、腎機能障害を誘発するリスクが高くなることが示された。RAS 阻害薬の中でも腎障害を特に増悪させる降圧薬を探索する必要があるが、これにはさらに症例を集積する必要がある。本項では、腎障害を RAS 阻害薬併用群の中で、治療開始時から治療終了時まで継続して腎機能の低下が確認された 1 例を記述する。

60 歳代の男性。胃癌のため CDDP、カペシタビンおよびトラスツズマブの併用療法が行われていた。既往歴は高血圧症、骨粗鬆症、肝硬変などであった。治療開始時の内服薬は TEL, ニセルゴリン, ゴピクロン, クエン酸第一鉄ナトリウム, スクラルファート水和物およびボノプラザンフマル酸塩であり、治療中にニセルゴリンがイブジラストへ切替となったことを除き、使用薬に変更はなかった。治療開始時の CRE, BUN および eGFR は 0.59 mg/dL, 10.9 mg/dL および 102.5 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> と正常であった。1 コース目終了後に、正常範囲内ではあるが CRE および BUN は、それぞれ 0.73 mg/dL および 15.7 mg/dL と上昇し始め、eGFR は、81.2 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> と低下し始めた。その後、血球減少のため、CDDP の投与量が第 2 コース目に 75%に減薬され、5 コース目に 60%に、6 コース目に 50%となった。CDDP を減量下にも関わらず、CRE, BUN の増加および eGFR の低下が続き、7 コース目終了後には、CRE 1.25 mg/dL, BUN 21.0 mg/dL, eGFR 44.9 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> となった。第 7 コース目終了後の治療効果の評価で progressive disease と判断され、本人希望により、その後の治療は行わないこととなった。

緒言に記述したように、腎毒性は CDDP の用量規定因子である。本症例では CDDP の減薬後も腎機能の低下は続き、第 7 コース目終了後の腎機能では CDDP の増量は、減薬基準に抵触するため不可能であった [2]。血球減少で減薬されていなかった場合、より早期に腎障害が増悪し、治療強度の低下が余儀なくされ、原疾患の治療を妨害した可能性が高い。

#### 1.4. 考 察

CDDP と降圧薬を併用しても、腎機能マーカーの変動や腎機能障害の発生率に影響しないことが示された。降圧薬併用群には異なる降圧機序をもつ薬剤が混在しており、その中には、腎障害に対する保護効果が報告されているものがある。例えば、Barrera ら [24] はラットに虚血性 AKI を発症させる前または後にスピロラク톤を投与することで、スピロラク톤非投与のラットと比較して、AKI のバイオマーカーである kidney injury molecule-1 が有意に低いことを報告している。また、Liu ら [25] は急性心筋梗塞患者に対して、心臓カテーテル検査または経皮的冠動脈形成術を行う前にビソプロロールを含む  $\beta$  遮断薬を投与すると、 $\beta$  遮断薬非投与患者と比較して、造影剤誘発性の AKI の発症率が低下することを報告している。以上より、降圧薬併用の有無ではなく、降圧機序毎に CDDP による腎障害への影響を検討する必要があると考えられた。本研究で、降圧薬併用群を RAS 阻害薬併用群と非 RAS 阻害薬併用群に分け比較した結果、腎機能マーカーの変動や腎機能障害の発生率に差が生じる可能性が示された。これらの結果から、CDDP による腎障害は、RAS 阻害薬によって増悪すると考えられた。今後、症例数を増やし、各 RAS 阻害薬と CDDP を併用した場合の腎機能マーカーの変動や腎障害の発症率をより大規模かつ詳細に調べる必要がある。また、RAS 阻害薬の併用により腎障害が増悪する機序の解明も必要である。

本論文では TEL と CDDP 併用の一例の自験例を示した。この症例では、CDDP を減薬しているにも関わらず、腎障害が進行していた。今後、症例をさらに集積する必要はあるが、RAS 阻害薬との併用で腎障害が増悪し、原疾患の治療が妨害されている症例は一定数存在すると思われる。実臨床では複数の既往症に対して、それぞれの薬物治療が行われている場合が多い。Kang ら [26] は多剤併用により、腎障害を起こすリスクが高くなることを報告している。また、Chao ら [27] は降圧薬、抗不整脈薬、硝酸薬、脂質異常症治療薬などの薬剤が追加される毎に AKI を起こすリスクが 30% 高くなることを報告している。本研究の対象患者の中には複数の降圧薬を併用している症例もみられた。Ameen ら [28] は CKD 患者において、アムロジピンとバルサルタンの併用がバルサルタン単独群と比較して有意に尿中アルブミン値を低下させ、CKD に対して保護作用を示すことを報告している。このように、異なる降圧薬の併用によっても、腎障害に及ぼす影響は変化する可能性がある。そのため、臨床現場で個々の薬剤の腎障害に及ぼす影響や腎障害を増悪させる機序を解明するには限界がある。この課題を解決し、臨床で CDDP の治療強度を下げずに化学療法を行うためには、リバーストランスレーショナルな視点からの基礎データの集積が必要と考えられた。

## 第2章 降圧薬がCDDP誘発性のAKIに与える影響：マウスを用いた検討

### 2.1. 背景・目的

第1章では、ヒトを対象とした臨床研究によって、1) CDDPと降圧薬を併用しても、腎機能マーカーの変動や腎機能障害の発症率には影響しないこと、2) 降圧薬併用群をRAS阻害薬併用群と非RAS阻害薬併用群に分けて比較すると、腎機能マーカーの変動や腎機能障害の発症率に差があることを示した。

ラットを用いた先行研究で、RAS阻害薬のうちLOSは、CDDPとの併用でCDDP誘発性の腎障害を軽減させたことが報告されている[21]。また、Zamaniら[29]は雄性ラットでCDDPとENAの併用により腎障害が増悪することを報告している。逆に、Raniら[30]は、ENAがCDDP誘発性の腎障害を軽減すると報告している。このように、基礎研究においてもRAS阻害薬がCDDP誘発性の腎障害に与える影響について、統一した見解は得られていない。また、血圧低下とCDDP誘発性の腎障害が相関するという報告[20]があるが、血圧低下により腎機能障害が増悪する機構は解明されていない。

本章では、第1章の結果を動物実験によってリバーストランスレショナルに検証することを目的とした。検証に用いた降圧薬は、厚生労働省の第3回レセプト情報・特定健診等情報データベース[31]で使用頻度が高いことが示されているTEL、ENA、AMLにTELとは代謝経路と受容体に対する特異性が異なるLOSを加え、CDDPによるAKIに対する降圧薬併用の影響およびAKIの発症機序の解明を試みた。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 実験動物

BALB/cマウス(6週齢, 雄性)は日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入した。マウスは、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度47~67%、明暗サイクル12時間の環境下で飼育し、餌(RCF-1(オリエンタルバイオ株式会社, 京都))および水は自由摂取とした。なお、本研究は摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。許可番号: K17-15, K18-15

#### 2.2.2. 実験プロトコル

BALB/cマウス(6週齢, 雄性)を以下の10群に分け、腎障害の程度を調べた(図3)。

- 1) Control群 (n=7, 未処置)
- 2) CDDP単独群 (n=5, CDDP (FUJIFILM和光純薬工業株式会社) 15 mg/kg)
- 3) CDDP+AML併用群 (n=5, CDDP および AML (ノルバスク®, ファイザー株式会社)

- 社, 東京) 5 mg/kg)
- 4) CDDP+ENA 併用群 (n=5, CDDP および ENA (レニベース®, MSD 株式会社, 東京) 2.5 mg/kg)
  - 5) CDDP+TEL 併用群 (n=4, CDDP および TEL (ミカルデイス®, 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社, 東京) 10 mg/kg)
  - 6) CDDP+LOS 併用群 (n=4, CDDP および LOS (ニューロタン®, MSD 株式会社) 10 mg/kg)
  - 7) AML 単独群 (n=6, AML 5 mg/kg)
  - 8) ENA 単独群 (n=5, ENA 2.5 mg/kg)
  - 9) TEL 単独群 (n=5, TEL 10 mg/kg)
  - 10) LOS 単独群 (n=5, LOS 10 mg/kg)

なお, CDDP は 1 回のみ腹腔内投与し, CDDP の投与日を day 0 とした. また, 実際の臨床状況を再現するため, 各降圧薬はシスプラチン投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 4) まで 1 日 1 回経口投与した. 経口投与には, 経口ゾンデ針 (φ0.9x70 mm, 夏目製作所) を用いた.

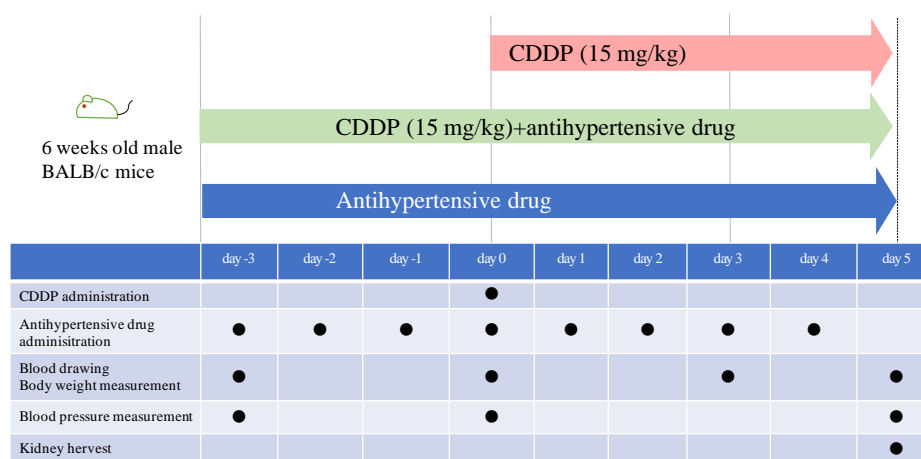


図 3 実験プロトコル (CDDP 単回投与)

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=7, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP: 15 mg/kg, 腹腔内投与), CDDP+各降圧薬併用群 (AML 併用群 (n=5, 5 mg/kg), ENA 併用群 (n=5, 2.5 mg/kg), TEL 併用群 (n=4, 10 mg/kg), LOS 併用群 (n=4, 10 mg/kg), 経口投与) および各降圧薬単独群 (AML 単独群 (n=5, 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, 2.5 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, 10 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, 10 mg/kg), 経口投与) に分けた. CDDP の投与日を 0 日目 (day 0) とし, 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 4) まで 1 日 1 回経口投与した. Day -3, day 0, day 3 および day 5 に収縮期血圧の測定と採血を行い, day 5 に屠殺後, 腎臓を採取した.

### 2.2.3. 収縮期血圧の測定

収縮期血圧 (sBP, systolic blood pressure) は, マウス・ラット用無加温型非観血式血圧計 (MK-2000, 室町紀海株式会社, 東京) を用いて, day -3, day 0, および day 5 に測定した.

### 2.2.4. 採血および血清の分離

Day -3, day 0, day 3 および day 5 に尾静脈から採血した. 採血には, ヘマトクリット毛細管 (microhematocrit capillary tube, MARIENFELD, Germany) を用いた. 採血後, 室温で1時間静置し, ヘマトクリット遠心機 (F20178-A-000, 株式会社久保田製作所, 東京) を用いて遠心分離 (12000 rpm, 5分間) し, 血清を得た. 血清はサンプリングチューブ (DNA-02C, 株式会社バイオメディカルサイエンス) に入れ,  $-80^{\circ}\text{C}$  に設定した冷凍庫に保存した.

### 2.2.5. CRE および BUN 濃度の測定

本章 2.2.4. で得た血清を用いて, BUN および CRE 濃度を測定した. 測定は乾式臨床科学分析装置 (スポットケム EZ SP-4430, アークレイ株式会社, 京都) で行い, 試薬カードはスポットケム™II 腎機能-2 (アークレイ株式会社) を用いた.

### 2.2.6. 腎臓の採取

マウスにメデトミジン (0.75 mg/kg), ミダゾラム (4.0 mg/kg) およびブトルファノール (5.0 mg/kg) を腹腔内投与し, 正向反射がないことを確認した後, 滅菌鉗で腹部を切開した. 心臓を露出し, 左心室に翼状針を挿入し, 右心耳を切開後, ペリスタポンプ (SJ1211H, アトー株式会社, 東京) で PBS (PBS, phosphate-buffered saline) を灌流した. 灌流後, 腎臓を採取し, 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液, pH7.0 (FUJIFILM 和光純薬工業株式会社, 大阪) 中,  $4^{\circ}\text{C}$  に設定した冷蔵庫で終夜静置した.

### 2.2.7. 腎臓組織切片の作製

採取した組織 (2.2.6.) を tissue cassette (greiner labortechnik, Germany) に入れ, 自動固定包埋装置 (Cell & Tissue Processor CT-Pro20, ジェノスタッフ株式会社, 東京) を用いて浸透した. なお, 自動固定包埋装置の各層 (全 12 層) には, 80%エタノール, 95%エタノール (2 層), 100%エタノール (3 層), G-NOX (ジェノスタッフ株式会社) (3 層), パラフィン (HISTOPLAST, Shandon Scientific Ltd., Pittsburgh, PA, USA) (3 層) を予め準備した. 浸透スケジュールは, 80%エタノール: 2 時間, 95%エタノール: 2 時間, 95%エタノール: 1 時間, 100%エタノール: 1 時間 (3 層), G-NOX: 1 時間 (2 層), G-NOX: 2 時間,

パラフィン：2時間（3層）とした。パラフィン伸展機（EC-4030，アズワン株式会社，大阪）上でパラフィンを流し込んでおいたベースモールドに浸透処理が完了した組織を移し，tissue cassette を載せてパラフィンを流し込み包埋した。パラフィンが固まるまで室温に放置し，その後，4℃に設定した冷蔵庫で一夜静置した。

次に，パラフィンブロックをベースモールドから取り出し，ミクロトーム（ROM-380，大和光機工業株式会社，埼玉）を用いて，3 μm に薄切した。薄切した組織を，40℃に設定した湯浴に移し，組織が元の大きさになるまで伸展させた。続いて，MAS コート付きスライドガラス（S9442，松浪硝子工業株式会社，大阪）上に伸展させた組織を載せた。余分な水分を取り除いた後，45℃に設定したパラフィン伸展機上で2時間静置し，乾燥した。

#### 2.2.8. 腎線維化面積の評価

腎線維化面積は，Masson trichrome 染色によって評価した。組織切片をキシレン層（2層），100%エタノール層（2層）および70%エタノール層に各5分間出沒させ，パラフィンを除去した。4分間流水で洗浄した後，第一媒染液（武藤化学株式会社，東京）を20分間反応させ，3分間流水で洗浄した。続いて，マイヤーヘマトキシリン溶液（FUJIFILM 和光純薬工業株式会社）に5分間浸した後，5分間流水で洗浄した。続いて，第二媒染液（武藤化学株式会社）を滴下し30秒間反応させた後，1分間流水で洗浄した。次に1%酢酸溶液に5回浸し，0.75%オレンジG液（武藤化学株式会社）を1分間反応させた後，1%酢酸溶液に5回浸した。次に，マッソン染色液B（武藤化学株式会社）を5分間反応させた後，1%酢酸溶液に5回浸した。続いて，2.5%リタングステン酸溶液（武藤化学株式会社）を15分間反応させた後，1%酢酸溶液に5回浸した。アニリン青液（武藤化学株式会社）を30分間反応させた後，1%酢酸溶液に5回浸した。70%エタノール，80%エタノールおよび90%エタノール層の順に，それぞれ5秒間，10秒間および20秒間出沒した後，100%エタノール層（3層）に60秒間出沒し，脱水した。キシレン層（4層）に60秒間出沒し，透徹した。最後に，カナダバルサム（FUJIFILM 和光純薬工業株式会社）で封入し，顕微鏡（OLYMPUS BX50，東京）で検鏡し，腎皮質を撮影した。続いて，糸球体領域を各視野から除去し，アニリンブルー染料で染色された腎線維化領域を ImageJ ver. 1.41（National Institutes of Health, USA）を用いて抽出し，線維化面積を測定した。測定した腎線維化面積を間質面積で除して，腎線維化面積比を算出した。なお，個体ごとに3視野の腎線維化面積比を算出し，その平均値を統計解析に使用した。

### 2.2.9. 腎アポトーシス領域の評価

腎アポトーシス領域はTUNEL (TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) 染色により評価した。本章 2.2.8. と同様の方法で組織切片からパラフィンを除去した。パラフィンを除去した組織切片を 4 分間流水で洗浄した後、PBS に浸し、5 分間洗浄した。続いて、proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を PBS で 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、組織切片に滴下し、室温で 15 分間反応させた。PBS を用いて洗浄 (2 分間, 2 回) した後、ApopTag<sup>®</sup> equilibration buffer (Merck KGAA, Germany) を滴下し、室温で約 10 秒間反応させた。ApopTag<sup>®</sup> reaction buffer (Merck KGAA) で 3.3 倍に希釈した ApopTag<sup>®</sup> terminal deoxynucleotidyl transferase (Merck KGAA) を滴下し、37°C で 60 分間反応させた。精製水で 34 倍に希釈した stop/wash buffer (Merck KGAA) に浸し、室温で 10 分間反応させた後、PBS で洗浄した (1 分間, 3 回)。以下の作業は遮光下で行った。Anti digoxigenin peroxidase (Merck KGAA) を滴下し、室温で 30 分間反応させ、PBS で洗浄した (2 分間, 4 回)。対比染色として PBS で 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように希釈した Hoechst 33342 (Lonza Walkersville, Inc., USA) を滴下し、30 分間核染色後、PBS で洗浄した (5 分間, 2 回)。最後に、グリセロール (FUJIFILM 和光純薬工業株式会社) で封入し、蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス BZ-X800, 大阪) で検鏡し、腎皮質を撮影した。BZ-X800 アナライザー (株式会社キーエンス) を用いて、TUNEL 陽性細胞の面積を算出した。

### 2.2.10. 腎障害発症率の評価

本章 2.2.2. で群分けしたマウスのうち、CDDP 単独群の CRE, BUN および腎線維化面積比の平均値を算出した。この値の 1.5 倍を上回った個体を腎障害発症個体と定義し、全個体数に対する腎障害発症個体数を発症率として各群で算出した。

### 2.2.11. 統計解析

全てのデータは平均値 + 標準偏差 (SD) で示した。各群間の CRE および BUN の統計学的有意差は、Steel-Dwass 検定で解析し、 $P < 0.05$  を有意差有りとした。CRE あるいは BUN と sBP との相関の統計学的有意性は、スピアマンの順位相関係数で表した。また、2 群間の比較はフィッシャーの直接確率検定で解析した。全ての統計解析は、R (The R Foundation for Statistics Computing, Australia) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (埼玉医療センター, 自治医科大学, 埼玉) を用いた。



## 2.3. 結果

### 2.3.1. CDDP と降圧薬の併用が腎機能マーカー（CRE および BUN）に及ぼす影響（CDDP 単回投与）

CDDP と降圧薬の併用が腎機能に及ぼす影響を確認するため、BALB/c マウス（6週齢, 雄性）を 1) control 群, 2) CDDP 単独群, 3) CDDP+AML 併用群, 4) CDDP+ENA 併用群, 5) CDDP+TEL 併用群, 6) CDDP+LOS 併用群, 7) AML 単独群, 8) ENA 単独群, 9) TEL 単独群および 10) LOS 単独群に分けて、CRE および BUN の変動を比較した。降圧薬の投与量は、各降圧薬がマウスの血圧を未処置群と比較して有意に低下させたという報告に基づいて決定した [32-36]。また、CDDP の投与量（15 mg/kg）は、未治療群と比較して、投与 3 日目の CRE および BUN が有意に増加したという Pei ら [37] の報告および同用量の CDDP を投与してから 5 日以内にマウスは死亡しないという Sasaki ら [38] の報告に基づいて決定した。

各採血日の CRE と BUN を図 4 に示した。治療期間中、CDDP と CCB である AML 併用群の CRE および BUN は CDDP 単独群と同程度であった。RAS 阻害薬との併用、即ち、CDDP+ENA 併用群、CDDP+LOS 併用群および CDDP+TEL 併用群では CDDP 単独群と比較して day 3~day 5 で CRE および BUN に上昇が見られた。特に、CDDP+TEL 併用群では強い上昇がみられた。

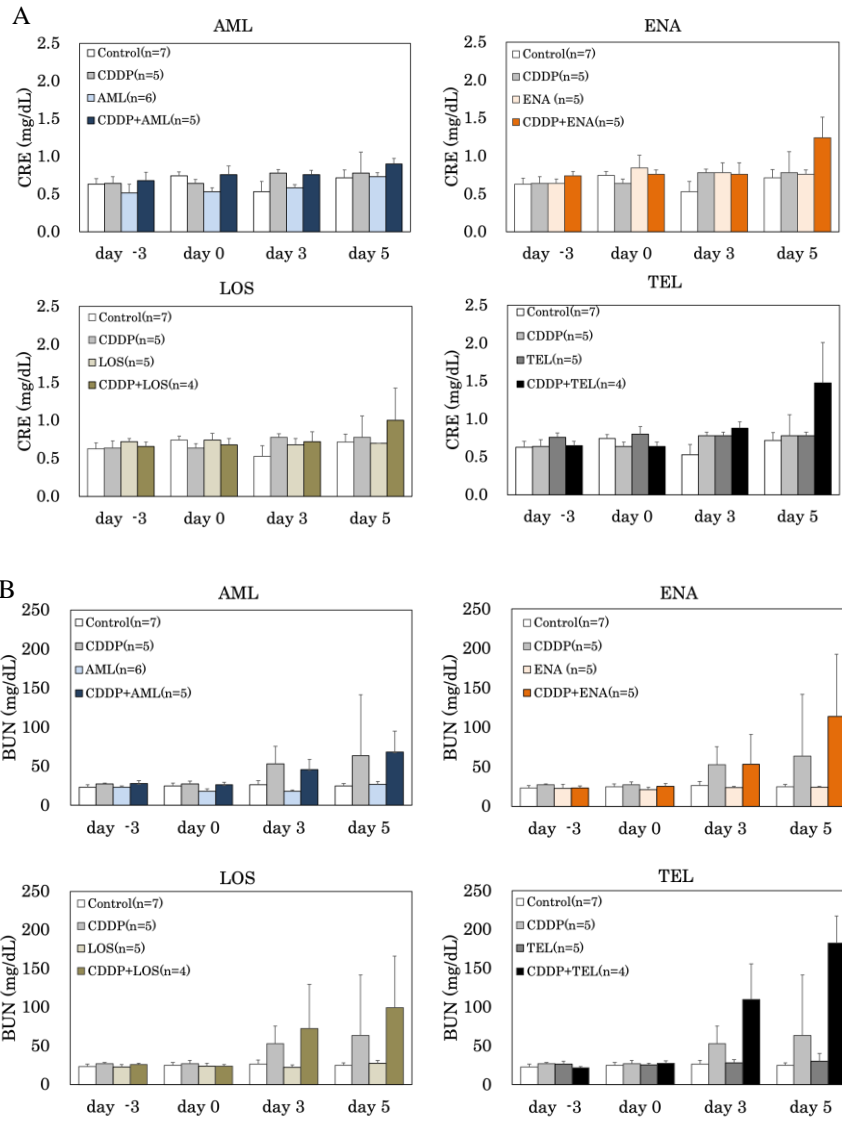


図4 CDDP (単回投与), 各降圧薬あるいはCDDPと各降圧薬の併用が腎機能に与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=7, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 15 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+LOS 併用群 (n=4, LOS : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=4, TEL : 10 mg/kg), AML 単独群 (n=6, AML : 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg) および TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg) に分けた. CDDP の投与日を day 0 とし, 各降圧薬を day -3 から屠殺前日 (day 4) まで 1 日 1 回経口投与した. Day -3, day 0, day 3 および day 5 の血清を採取した. 各個体の (A) 血清クレアチニン (CRE) および (B) 血液尿素窒素 (BUN) を測定し, 平均値+標準偏差 (SD) を算出した.

### 2.3.2. sBP と生化学的パラメータ間の相関

前項で記述したように, CDDP と RAS 阻害薬を併用すると, 腎障害マーカー (CRE および BUN) の上昇がみられた. この腎障害マーカーの変動と血圧低下との相関を確認するため, day 3 と day 5 の CRE および BUN の差を  $\Delta$ CRE,  $\Delta$ BUN, sBP の差を  $\Delta$ sBP とし,  $\Delta$ CRE または  $\Delta$ BUN と  $\Delta$ sBP との相関関係を調べた.

降圧薬単独群では  $\Delta$ sBP と  $\Delta$ CRE,  $\Delta$ sBP と  $\Delta$ BUN に有意な相関はみられなかった (図 5A, CRE:  $r=0.33$ ,  $P=0.14$ , BUN:  $r=-0.19$ ,  $P=0.40$ ). また, CDDP と各降圧薬併用群も同様に有意な相関はみられなかった (図 5B, CRE:  $r=0.16$ ,  $P=0.51$ , BUN:  $r=-0.21$ ,  $P=0.40$ ).

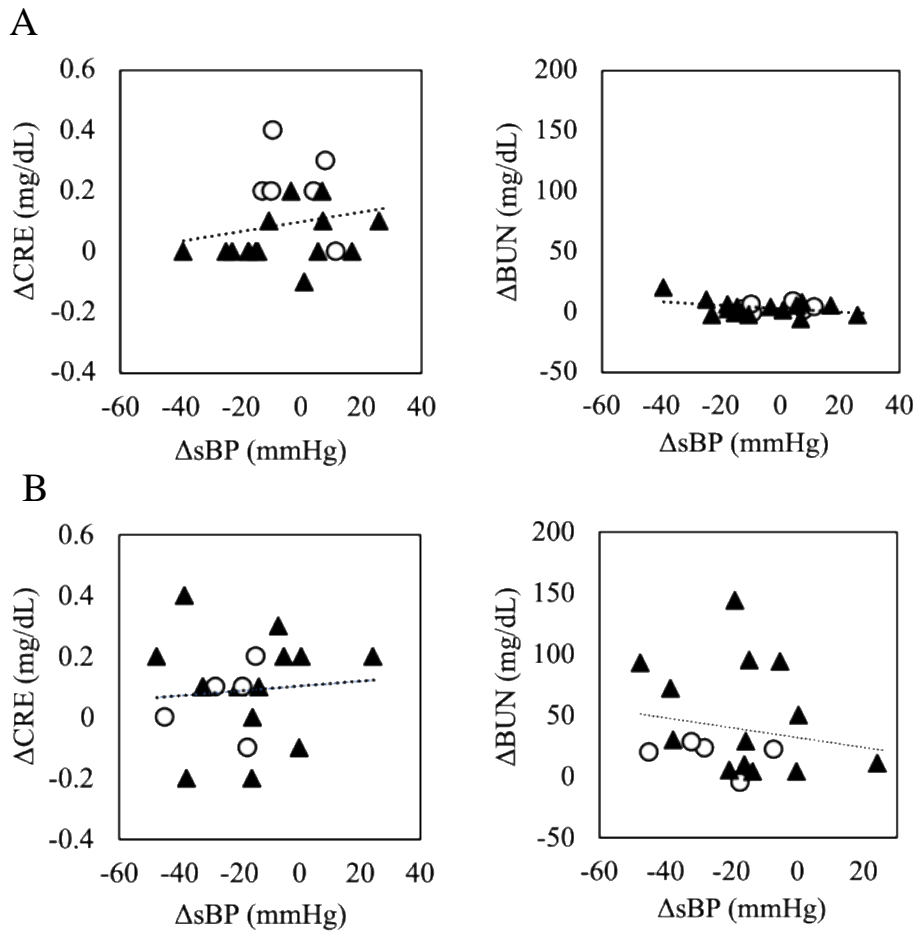


図5 収縮期血圧と腎機能マーカーの相関関係

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を AML 単独群 (n=6, AML : 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=4, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+LOS 併用群 (n=4, LOS : 10 mg/kg) に分けた. CDDP の投与日を day 0 とし, 各降圧薬を day -3 から屠殺前日 (day 4) まで 1 日 1 回経口投与した. Day 3 および day 5 に収縮期血圧 (sBP) の測定と採血を行い血清クレアチニン (CRE) および血液尿素窒素 (BUN) を測定した. 各個体の day 3 と day 5 の sBP, CRE および BUN の差を算出し, (A) 降圧薬単独群 (AML, ENA, TEL および LOS 単独群) と (B) CDDP+各降圧薬併用群 (CDDP+AML, CDDP+ENA, CDDP+TEL および CDDP+LOS 併用群) に分け,  $\Delta$ sBP と  $\Delta$ CRE あるいは  $\Delta$ sBP と  $\Delta$ BUN の相関関係を調べた. なお, ▲は RAS 阻害薬 (ENA, TEL あるいは LOS) を投与した個体, ○は AML を投与した個体を示す.

### 2.3.3. CDDP と降圧薬の併用が腎線維化領域に及ぼす影響 (CDDP 単回投与)

降圧薬の併用による AKI の程度を組織学的に評価するため、各個体の腎臓のパラフィン切片を作製し、Masson trichrome 染色によって腎間質面積に対する腎線維化面積比を算出して、比較した (図 6A, 6B)。なお、腎線維化面積は、各視野から糸球体領域を除去し、アニリンブルー染料で染色された腎線維化領域を抽出することで算出した。その結果、CDDP 単独群は control 群および各降圧薬単独群と比較して腎線維化面積比が増加する傾向がみられた。CDDP+ENA 併用群および CDDP+TEL 併用群は control 群、各降圧薬単独群および CDDP 単独群と比較して増加していた。特に CDDP+TEL 併用群は CDDP 単独群と比較して腎線維化面積比が有意に増加していた。

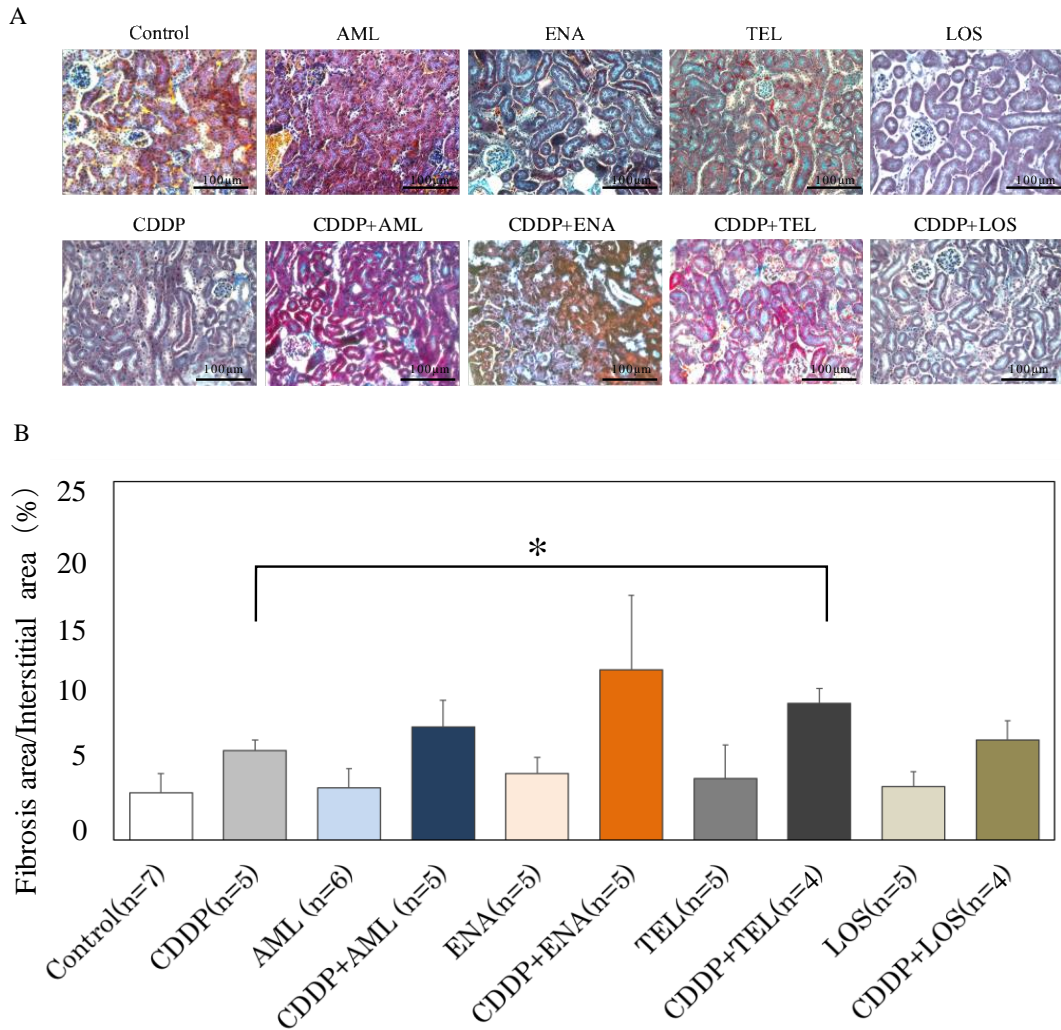


図6 CDDP (単回投与), 各降圧薬あるいはCDDPと各降圧薬の併用が腎線維化に与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=7, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 15 mg/kg), AML 単独群 (n=6, AML : 5 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=4, TEL : 10 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg) および CDDP+LOS 併用群 (n=4, LOS : 10 mg/kg) に分けた. CDDP の投与日を day 0 とし, 各降圧薬を day -3 から屠殺前日 (day 4) まで 1 日 1 回経口投与した. Day 5 に採取した腎臓からパラフィン切片を作製し, (A) Masson trichrome 染色を行った. 染色像から腎線維化領域を抽出し, (B) 各群の腎間質面積に対する線維化面積の割合を算出した. なお, 統計学的有意差は, Steel-Dwass 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

#### 2.3.4. CDDP と降圧薬の併用が腎細胞死（アポトーシス）に及ぼす影響（CDDP 単回投与）

前項で記述したように，CDDP と降圧薬，特に TEL を併用すると，腎線維化面積が増加した．次に，腎細胞死への影響を評価するため，本章 2.3.3. と同様に各個体の腎臓のパラフィン切片を作製し，TUNEL 染色を行い，TUNEL 陽性細胞領域を抽出して，腎間質面積に対する割合を算出した（図 7A, 7B）．その結果，CDDP 単独群は，control 群と比較して，腎アポトーシス領域が増加する傾向がみられた．また，全ての降圧薬併用群は CDDP 単独群と比較して腎アポトーシス領域が増加していた．

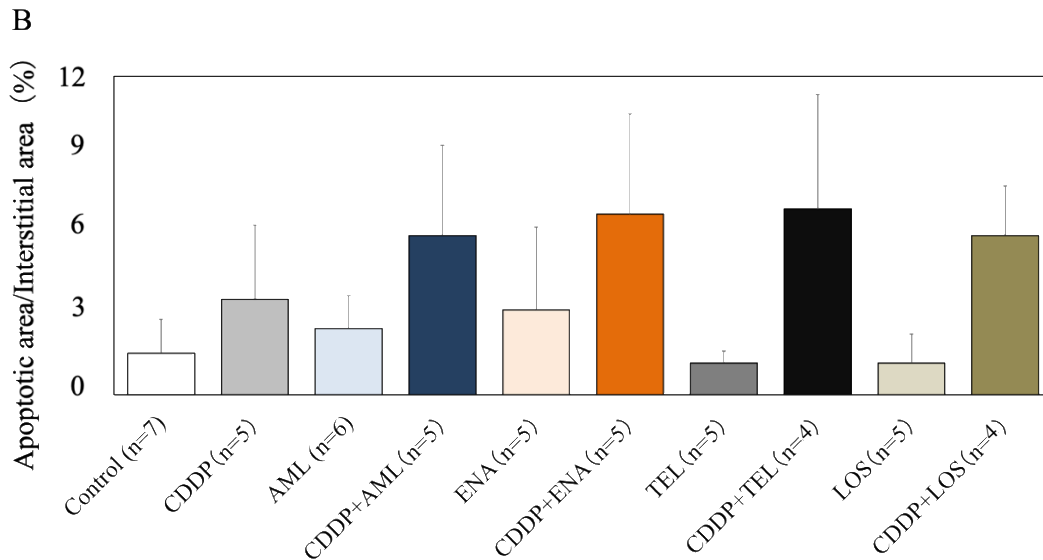
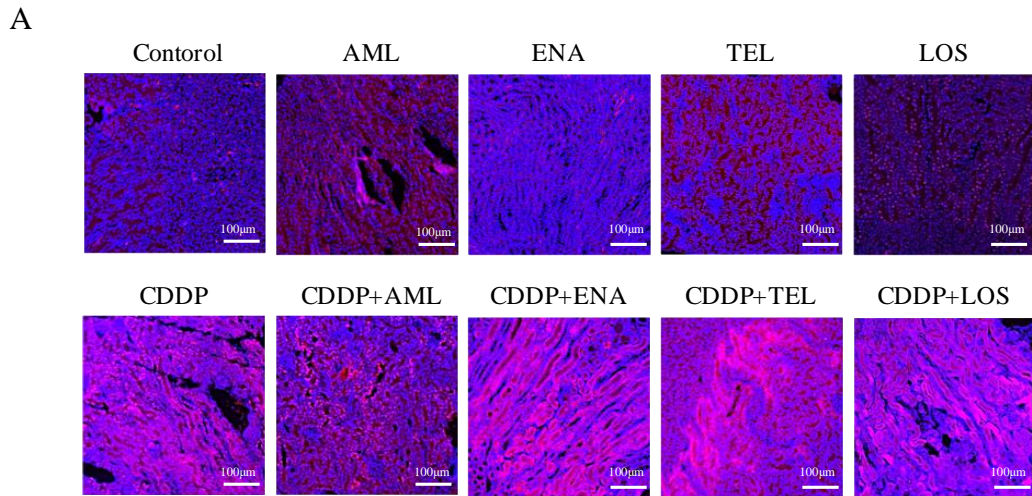


図7 CDDP (単回投与), 各降圧薬あるいはCDDPと各降圧薬の併用がアポトーシスに与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=7, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 15 mg/kg), AML 単独群 (n=6, AML : 5 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=4, TEL : 10 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg) および CDDP+LOS 併用群 (n=4, LOS : 10 mg/kg) に分けた. CDDP の投与日を day 0 とし, 各降圧薬を day -3 から屠殺前日 (day 4) まで 1 日 1 回経口投与した. Day 5 に採取した腎臓からパラフィン切片を作製し, (A) TUNEL 染色を行った. 染色像から TUNEL 陽性細胞領域を抽出し, (B) 各群の腎間質面積に対するアポトーシス領域の割合を算出した.



### 2.3.5. CDDP と降圧薬の併用が腎機能障害の発症率に及ぼす影響 (CDDP 単回投与)

CDDP と降圧薬の併用が腎障害の発症率に与える影響を検討した。CDDP 単独群の CRE, BUN および腎線維化面積比の平均値を算出し, これらの値の 1.5 倍を上回った個体を「腎障害あり」と定義し, 発症率を算出した。なお, CRE の平均値は 0.78 mg/dL, 同じく BUN は 63.6 mg/dL および腎線維化面積比は 6.3%であった。その結果, CDDP+ENA 併用群では CRE で 5 個体中 3 個体 (60%) が, BUN で 2 個体 (40%) が発症と判定された。CDDP+TEL 併用群では CRE で 4 個体中 3 個体 (75%) が, BUN では全ての個体が, 腎線維化面積比では 2 個体 (50%) が発症と判断された。中でも CRE および BUN は有意に発症と判定された。また, CDDP+LOS および CDDP+AML 併用群の発症率は低かった (図 8)。

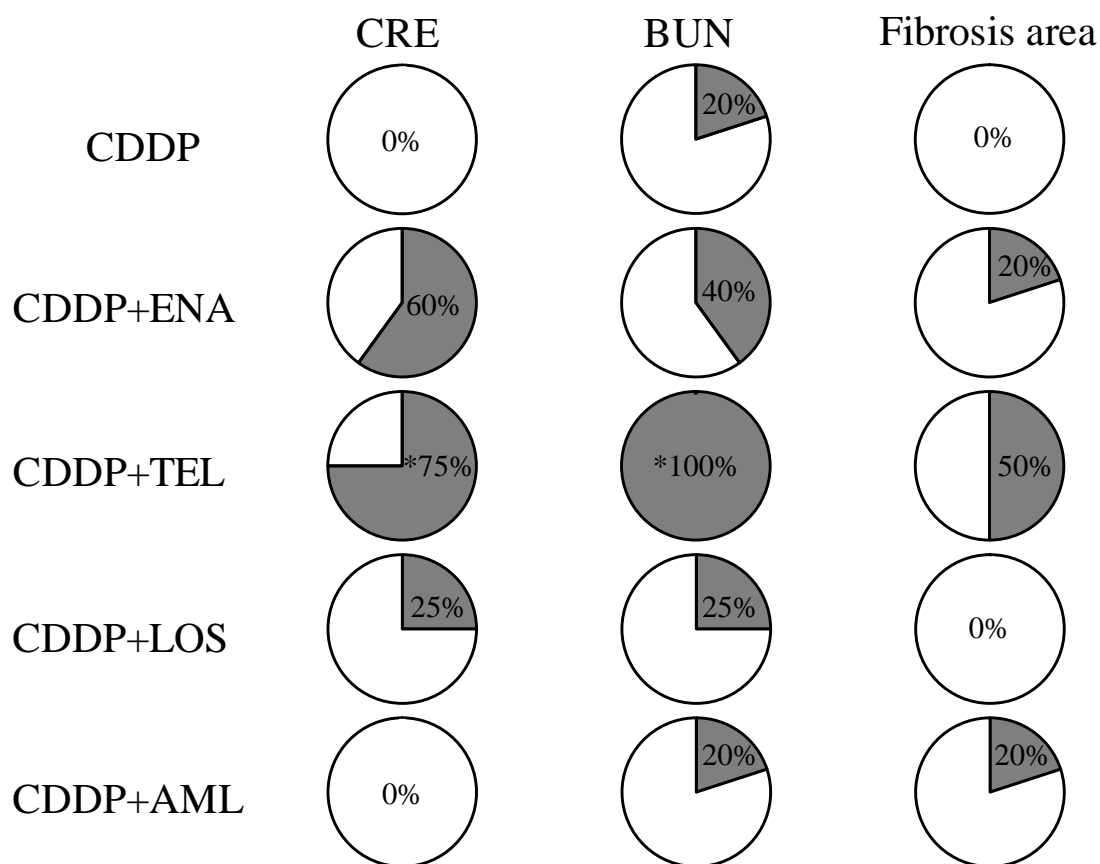


図8 CDDP（単回投与）による腎障害の発症率とCDDPと各降圧薬併用による腎障害の発症率の比較

BALB/c マウス（6週齢, 雄性）をCDDP単独群（n=5, CDDP: 15 mg/kg）, CDDP+ENA併用群（n=5, ENA: 2.5 mg/kg）, CDDP+TEL併用群（n=4, TEL: 10 mg/kg）, CDDP+LOS併用群（n=4, LOS: 10 mg/kg）およびCDDP+AML併用群（n=5, AML: 5 mg/kg）に分けた。CDDPの投与日をday 0とし、各降圧薬をday -3から屠殺前日（day 4）まで1日1回経口投与した。Day 5に採血を行い血清クレアチニン（CRE）および血液尿素窒素（BUN）を測定した。また、day 5に採取した腎臓からパラフィン切片を作製し、Masson trichrome染色像から腎間質面積に対する線維化面積の割合を算出した。CDDP単独群のCRE, BUNおよび腎線維化面積比の平均値を算出し、その値の1.5倍を上回る個体を腎障害あり（■）と定義して腎障害発症率を算出した。なお、CDDP単独群との統計学的有意差は、フィッシャーの直接確率検定を用いて解析し、 $P < 0.05$ を有意差あり（\*）とした。

## 2.4. 考 察

CDDP 誘発腎毒性の要因は不明であるが、本章の結果から、降圧薬、特に RAS 阻害薬が、マウスの CDDP 誘発性腎障害を増悪させることが示された。これは、第 1 章（ヒトでの知見）と一致している。CRE および BUN から算出した AKI の発症率は、CDDP と RAS 阻害薬との併用で増加しており、特に、ENA および TEL は他の降圧薬と比較して、CDDP による AKI を増悪させる危険性が高いことが示された（図 8）。また、TEL と同じ降圧機序を持つ LOS も CDDP と併用することで、CRE および BUN が増加傾向となることが示された（図 4）。この結果とは対照的に、Saleh ら [21] は、LOS が抗酸化作用を介して CDDP による腎障害に対して腎保護作用を有することを報告している。この報告では、ラットに CDDP (7 mg/kg) を単回投与、LOS を高用量 (60 mg/kg) 単回投与、または低用量 (10 mg/kg) を連日投与しており、本研究とはデザインが異なる。即ち、LOS または CDDP の投与量と投与期間が LOS の腎保護作用に影響を与えている可能性が考えられた。

本章では TEL が他の降圧薬と比較して、CDDP による AKI を強く増悪させる結果が示された。Abuelo ら [39] は、RAS 阻害薬が輸出細動脈の拡張によって腎灌流を減少させ、血圧が正常であっても虚血性の AKI を引き起こすことを報告している。TEL は本章で使用した RAS 阻害薬の中で最も半減期が長い(20-24 時間)。さらに、同じアンジオテンシン II 受容体拮抗薬である LOS と比較し、アンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1R, angiotensin II type 1 receptor) に対して 27 倍高い選択性を示す [40]。以上より、CDDP+TEL 併用群では腎灌流が減少していたと考えられる。腎灌流の減少により、血中の TEL 滞留時間が延長し、強力な RAS 阻害作用が発現したことで、他の降圧薬と比較して、CDDP による腎障害をより増悪させたと考えられた。一方で TEL はアンジオテンシン II 2 型受容体 (AT2R, angiotensin II type 2 receptor) への親和性が低く、AT1R に選択性が高いことが報告されている [41]。そのため、AT1R の拮抗により血漿中のアンジオテンシン II が増加し AT2R を刺激する可能性がある。AT2R の刺激によって臓器線維化が抑制されることが報告されているが [42]、本研究では TEL の併用により腎線維化面積比が有意に増加した。従って、AT2R 活性化による抗線維化作用を上回る腎障害の増悪因子が存在する可能性がある。Husseiny ら [43] は、CDDP が尿細管を萎縮させることを報告しており、TEL の併用による腎灌流の減少が CDDP 誘発性の尿細管萎縮に何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。ENA も同様の機序によって CDDP による腎障害を増悪させることが推測されたが、TEL のように強い腎機能障害増悪作用は見られなかった。TEL と ENA の違いを評価するには、さらなる研究が必要である。一方、RAS 阻害薬併用群とは異なり、CDDP+AML

群では腎毒性は認められなかった。Hayashi ら [44] は L 型カルシウムチャネル遮断薬が主に輸入細動脈を拡張すると報告している。この機序が腎機能低下の程度の違いに影響を及ぼしていると考えられる。

先行研究では、血圧の低下と CDDP 誘発腎毒性との間に相関性があると報告されている [20]。一方、本研究では sBP と CRE あるいは BUN に相関関係はみられなかった (図 5)。この結果から、血圧以外の要因が CDDP による腎障害を増悪させていることが示唆された。なお、本研究では CDDP 単独群および CDDP+各降圧薬併用群の sBP は各降圧薬単独群と比較して低い傾向がみられた。

Isabelle ら [43] は、ラットに CDDP を投与すると CDDP を投与しない群と比較して、有意に体重が減少すると報告している。本研究でも CDDP が投与された全ての群 (CDDP 単独群および CDDP+降圧薬併用群) の day 3 および day 5 の体重は CDDP の投与がない群 (control 群および降圧薬単独群) と比較して有意に減少していた (結果非提示)。さらに、肥満の 2 型糖尿病患者や非肥満の高血圧症患者において、体重減少により、血圧が有意に低下することが報告されている [46-47]。以上より、CDDP の投与によって体重減少が生じたことで、血圧が低下したと考えられる。

CDDP による腎障害発生の機序の 1 つに腎細胞のアポトーシスの誘発が報告されている [48]。Terada ら [49] は、アポトーシス促進遺伝子であるアポトーシスシグナル調節キナーゼ 1 遺伝子を欠損する AKI モデルマウスは、wild-type マウスと比較して血清 CRE および BUN が有意に低いことを報告している。さらに、Kuwana ら [50] は、セリン-スレオニンキナーゼ Akt の活性化によってアポトーシスを抑制するホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ  $\gamma$  遺伝子を欠損するマウスは、CDDP 誘発腎毒性モデルにおいて、wild-type マウスと比較して、CRE および BUN が有意に高いことを報告している。本章の結果では、CDDP 単独群の腎アポトーシス面積比は、control 群と比較して増加する傾向がみられた。さらに CDDP+各降圧薬併用群の腎アポトーシス領域は CDDP 単独群と比較して増加する傾向を示した (図 7)。以上より、CDDP と RAS 阻害薬などの降圧薬の併用により、正常な腎細胞にアポトーシスが誘導されやすくなることが示唆された。

以上の結果から、マウスを用いた検討でも、第 1 章と同様に RAS 阻害薬を CDDP と併用すると、CDDP 誘発性の AKI が増悪することが示された。また、腎障害の増悪機序には血圧以外の要因が存在する可能性を示した。さらに、ENA および TEL の併用が他の降圧薬の併用と比較して CDDP 誘発性の腎障害を強く増悪させることが明らかとなった。

## 第3章 降圧薬が CDDP 誘発性の CKD に与える影響

### 3.1. 背景・目的

第2章では、降圧薬、特に RAS 阻害薬と CDDP の併用により CDDP 誘発性の AKI が増悪することが示された。また、RAS 阻害薬の中でも、ENA および TEL との併用で高頻度に AKI が増悪する可能性を示した。ただし、実臨床では化学療法レジメン毎に定められた休薬期間をとり、抗がん剤を反復的に投与する。例えば、非小細胞肺癌に対する CDDP とドセタキセルの併用療法では、治療初日に 80 mg/m<sup>2</sup> の CDDP と 60 mg/m<sup>2</sup> のドセタキセルの点滴静注を行い、3 週間休薬する。以上を 1 コースとして、繰り返し実施する [51]。また、CDDP 誘発性の AKI は、CKD に移行することも報告されている [3]。以上より、実臨床と同様にマウスに CDDP を反復投与して、降圧薬が CDDP 誘発性の CKD に与える影響を検討する必要がある。また、第2章で CDDP と降圧薬の併用により、腎線維化面積比の増加傾向が示された。腎機能が低下した症例では腎間質に線維化が認められると報告されており [52]、降圧薬が腎線維化を増悪させる機序の解明が必要である。腎線維化の要因は、尿細管萎縮や糸球体血流量の減少が関与していると考えられている [53]。腎線維化に関わる細胞群に腎臓に局在する線維芽細胞や骨髄由来細胞、上皮間葉転換 (EMT, epithelial-mesenchymal transition) 由来細胞、内皮間葉転換由来細胞があり、特に EMT 由来細胞と骨髄由来細胞の関与が大きいと考えられている [54]。EMT による腎線維化では尿細管上皮細胞が形質転換成長因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) によって刺激され、間葉系細胞に変化することが知られている。間葉系細胞は、 $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) やフィブロネクチンなどを発現することが報告されている [55]。また、EMT では、細胞接着分子である E-cadherin の発現量の低下が、細胞の遊走能および浸潤能を亢進させ、上皮細胞から間葉系細胞への変化に寄与することも報告されている [56]。以上より、 $\alpha$ -SMA と E-cadherin は EMT の指標として用いられている。また、腎線維化に対する EMT の影響を確認する目的でも用いられている。実際に、Jang ら [57] は、片側尿管結紮により腎線維化を誘導したマウスの腎組織では、 $\alpha$ -SMA 発現領域が増加し、E-cadherin 発現領域が減少することを報告している。本章では、マウスに CDDP を反復投与し第2章と同様の降圧薬を併用し、1) CDDP 誘発性の CKD に及ぼす影響および2) 腎線維化に対する EMT の関与を検討した。

## 3.2. 方法

### 3.2.1. 実験動物

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) は日本エスエルシー株式会社から購入した。飼育は, 第 2 章 2.2.1. と同様の方法で行った。

なお, 本研究は摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。  
許可番号 : K19-16

### 3.2.2. 実験プロトコル

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を以下の 10 群に分け, 腎障害の程度を調べた (図 9)。

- 1) Control 群 (n=5, 未処置)
- 2) CDDP 単独群 (n=5, CDDP (7 mg/kg, 腹腔内投与))
- 3) CDDP+AML 併用群 (n=5, CDDP および AML (5 mg/kg))
- 4) CDDP+ENA 併用群 (n=10, CDDP および ENA (2.5 mg/kg) または n=5, CDDP および ENA (1.25 mg/kg))
- 5) CDDP+TEL 併用群 (n=8, CDDP および TEL (10 mg/kg) または n=5, CDDP および TEL (5 mg/kg))
- 6) CDDP+LOS 併用群 (n=5, CDDP および LOS (10 mg/kg))
- 7) AML 単独群 (n=5, AML 5 mg/kg)
- 8) ENA 単独群 (n=5, ENA 2.5 mg/kg)
- 9) TEL 単独群 (n=5, TEL 10 mg/kg)
- 10) LOS 単独群 (n=5, LOS 10 mg/kg)

CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21)。また, 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した。経口投与には, 経口ゾンデ針 ( $\phi 0.9 \times 70$  mm, 夏目製作所) を用いた。

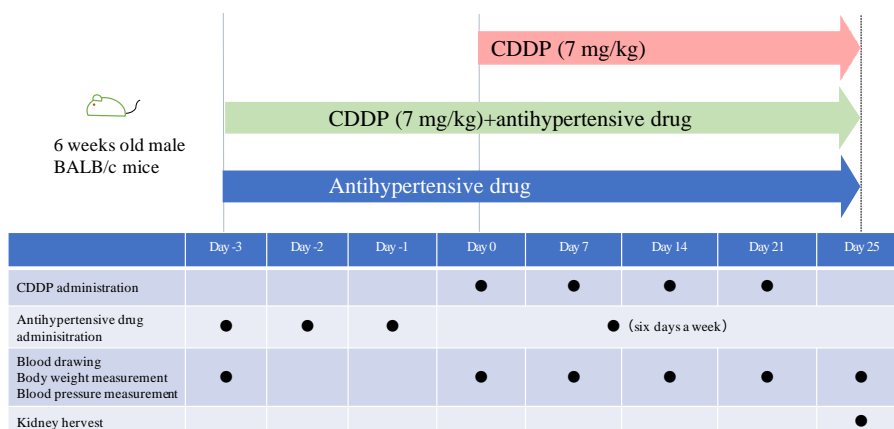


図9 実験プロトコル (CDDP 反復投与)

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=5, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP: 7 mg/kg, 腹腔内投与), CDDP+各降圧薬併用群 (AML 併用群 (n=5, 5 mg/kg), ENA 併用群 (n=10, 2.5 mg/kg または n=5, 1.25 mg/kg), TEL 併用群 (n=8, 10 mg/kg または n=5, 5 mg/kg), LOS 併用群 (n=5, 10 mg/kg), 経口投与) および各降圧薬単独群 (AML 単独群 (n=5, 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, 2.5 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, 10 mg/kg) および LOS 単独群 (n=5, 10 mg/kg), 経口投与) に分けた. CDDP の投与日を 0 日目 (day 0) とし, 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで週 6 回経口投与した. Day -3, day 0, day 7, day 14, day 21 および day 25 に収縮期血圧の測定と採血を行い, day 25 に屠殺後, 腎臓を採取した.

### 3.2.3. 収縮期血圧の測定

収縮期血圧 (sBP, systolic blood pressure) は, マウス・ラット用無加温型非観血式血圧計 (MK-2000, 室町紀海株式会社, 東京) を用いて, day -3, day 0, day 7, day 14, day 21 および day 25 に測定した.

### 3.2.4. 採血および血清の分離

Day -3, day 0, day 7, day 14, day 21 および day 25 に第 2 章 2.2.4. と同様の方法で採血および血清分離を行った.

### 3.2.5. CRE, BUN およびアルブミン濃度の測定

各個体 day -3, day 0, day 7, day 14, day 21 および day 25 に尾静脈から採血し, CRE, BUN およびアルブミン濃度を第 2 章 2.2.5. と同様の方法で測定し

た.

### 3.2.6. 腎臓の採取

マウスからの腎臓の採取は第2章2.2.6.と同様の方法で行った.

### 3.2.7. 腎臓組織切片の作製

腎臓組織切片の作製は第2章2.2.7.と同様の方法で行った.

### 3.2.8. 腎線維化面積の評価

第2章2.2.8.と同様の方法で Masson trichrome 染色および腎線維化面積比を算出した.

### 3.2.9. $\alpha$ -SMA 免疫染色

第2章2.2.8.と同様の方法で組織切片からパラフィンを除去した. 4分間流水で洗浄した後, 0.05% Tween20を含む10mMクエン酸ナトリウム緩衝液, pH6.0「クエン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0(クエン酸三ナトリウム・二水和物, FUJIFILM和光純薬工業株式会社, 大阪)」に浸し, 電子レンジを用いて抗原を賦活化した(750W, 5分間, 4回). 室温まで冷却し, wash buffer (PBSで40倍に希釈したTritonX-100)で洗浄した(5分間, 2回). Blocking solution (3%ウシ血清アルブミン (BSA, Albumin, Bovine, F-V, ナカライテスク株式会社, 京都)を含むPBS)に浸し, 60分間室温で保温した. 続いて, 一次抗体として, blocking solutionで1,000倍希釈した anti-alpha smooth muscle actin 抗体 [EPR5368] (ab124964) (abcam, UK)を滴下し, 60分間, 37°Cで保温後, 4°Cで一夜保温した. Wash bufferで洗浄(5分間, 2回)後, 以下の手順を遮光下で行った. 二次抗体として, blocking solutionで500倍希釈した goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (A11008) (Thermo Fisher Scientific, USA)を滴下し, 60分間, 37°Cで保温した. Wash bufferで洗浄(5分, 2回)後, 対比染色としてPBSで1  $\mu$ g/mLとなるように希釈した Hoechst33342 (LONZA Walkersville, USA)を滴下し1分間反応させ, 細胞核を染色した. Wash bufferで洗浄(5分間, 2回)し, 第2章2.2.8.と同様の方法で封入した.  $\alpha$ -SMA陽性細胞を蛍光顕微鏡(株式会社キーエンス BZ-X800, 大阪)で検鏡し腎皮質を撮影した. BZ-X800アナライザー(株式会社キーエンス)を用いて $\alpha$ -SMA陽性細胞領域の面積を算出した.

### 3.2.10. E-cadherin 免疫染色

本章3.2.9.と同様の方法で賦活化およびblocking solutionでの保温を行った. 続いて, 一次抗体として, blocking solutionで200倍希釈したE-cadherin



(24E10) rabbit mAb (Cell Signaling Technology, USA) を滴下し, 60 分間, 37°Cで保温後, 4°Cで一夜保温した. Wash buffer (本章 3.2.9. 参照) で洗浄 (5 分間, 2 回) 後, 以下の手順を遮光下で行った. Blocking solution で 500 倍希釈した goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (A11008) を滴下し, 60 分間, 37°Cで保温した. 本章 3.2.9. と同様に洗浄, Hoechst33342 で対比染色を行った. 続いて, PBS で 16 倍希釈した 0.4% trypan blue stain (Thermo Fisher Scientific, USA) を 1 分間反応させた. Wash buffer で洗浄 (5 分間, 2 回) し, 第 2 章 2.2.9. と同様の方法で封入した. E-cadherin 陽性細胞を蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス BZ-X800) で検鏡し腎皮質を撮影した. BZ-X800 アナライザー (株式会社キーエンス) を用いて, E-cadherin 陽性細胞領域の面積を算出した.

### 3.2.11. 統計解析

全てのデータは平均値+標準偏差 (SD) で示し, 生存率に対する統計学的解析は, log-rank 検定で解析し,  $P < 0.05$  を有意差有りとした. 腎線維化面積比と CRE, BUN あるいは $\alpha$ -SMA 領域との相関の統計学的有意性は, スピアマンの順位相関係数で表した. その他の統計解析は第 2 章 2.2.11. と同様の方法で行った.

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. CDDP と降圧薬の併用が腎機能マーカー (CRE および BUN) に及ぼす影響 (CDDP 反復投与)

CDDP と降圧薬の併用が CKD に及ぼす影響を確認するため, 雄性 BALB/c マウスを 1) control 群, 2) CDDP 単独群, 3) CDDP+AML 併用群, 4) CDDP+ENA 併用群 (ENA : 2.5 mg/kg), 5) CDDP+TEL 併用群 (TEL : 10 mg/kg), 6) CDDP+LOS 併用群, 7) AML 単独群, 8) ENA 単独群, 9) TEL 単独群および 10) LOS 単独群に分け, day -3, day 0, day 7, day 14, day 21 および day 25 に CRE および BUN を測定した. CDDP の投与量は, 実験期間の 25 日間で死亡せず, かつ腎線維化を誘導できる投与量を Cierra ら [58] の報告をもとに設定した.

Day 25 までの CRE を図 10A に示した. CDDP+AML 併用群および CDDP+ENA 併用群は全実験期間で control 群および CDDP 単独群と比較して有意な増加はみられなかった. CDDP+LOS 併用群は day 7 および day 14 において control 群および CDDP 単独群と比較して CRE の有意な上昇がみられたが, day 21 および day 25 では差はみられなかった. CDDP+TEL 併用群は day 14 において control 群および CDDP 単独群と比較して CRE の有意な増加がみられたが, day 21 および day 25 では差はみられなかった.

Day 25 までの BUN を図 10B に示した. day 14 から day 25 まで, 全ての降圧薬併用群で control 群および CDDP 単独群と比較して BUN の上昇がみられた. 特に CDDP+TEL 併用群では day 21 および day 25 において BUN の有意な上昇がみられた.

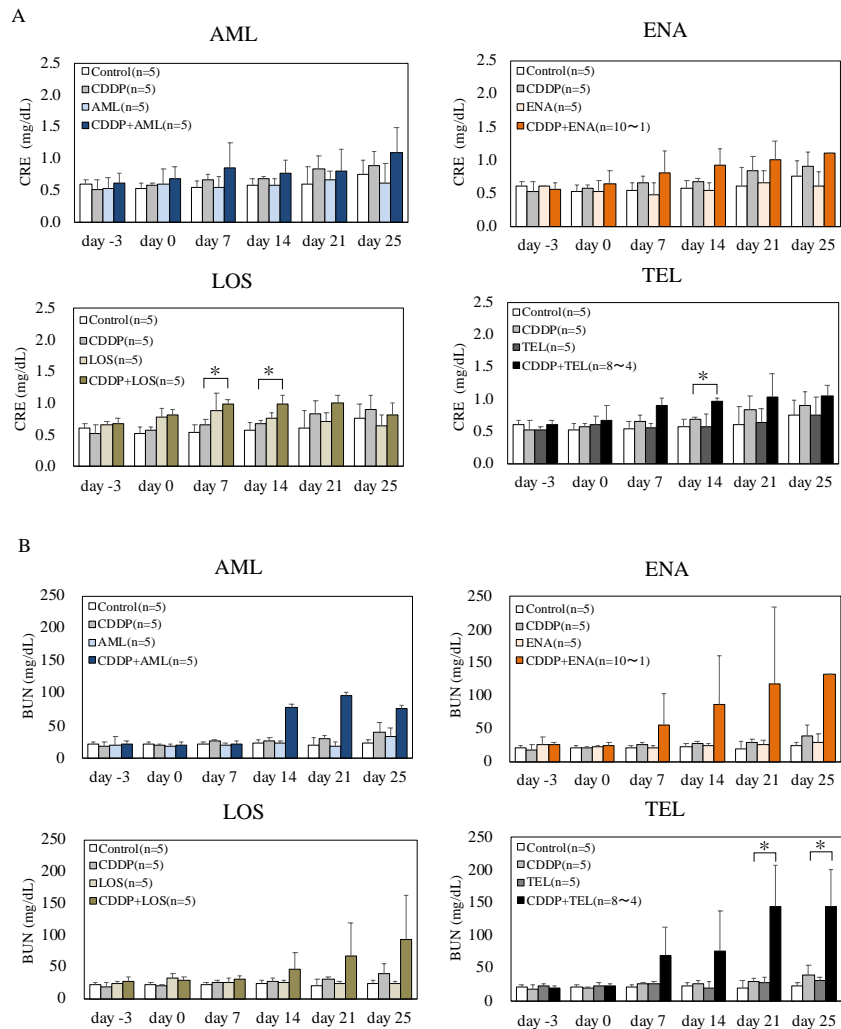


図 10 CDDP (反復投与), 各降圧薬あるいは CDDP と各降圧薬の併用が腎機能に与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=5, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 7 mg/kg, 腹腔内投与), AML 単独群 (n=5, AML : 5 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), CDDP+LOS 併用群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. Day -3, day 0, day 7, day 14, day 21, day 25 の血清を採取した. 各個体の (A) 血清クレアチニン (CRE) および (B) 血液尿素窒素 (BUN) を測定し, 平均値+標準偏差 (SD) を算出した. なお, 統計学的有意差は, Steel-Dwass 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

### 3.3.2. 生存曲線の比較

CDDP+ENA 併用群の 10 個体のうち day 12 に 1 個体, day 13 に 3 個体, day 18, day 20 および day 21 にそれぞれ 1 個体, day 24 に 2 個体, 合計 9 個体が死亡した (図 11A). CDDP+TEL 併用群では, 8 個体のうち day 5, day 12, day 22 および day 23 にそれぞれ 1 個体, 合計 4 個体が死亡した (図 11B). Control 群, CDDP 単独群, ENA 単独群および TEL 単独群では死亡個体は見られず, 併用群と他の群との間に生存率の有意な差が認められた (log-rank 検定).

死亡の原因が ENA および TEL の用量によるものかどうかを検討するため, 投与量を半量とした CDDP+Low ENA 併用群 (ENA : 1.25 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (TEL : 5 mg/kg) の生存率を調べた. CDDP+Low ENA 併用群の生存曲線を図 11A に示した. CDDP+Low ENA 群は 5 個体のうち day 18 に 1 個体が死亡した. Day 25 における生存率は 80%であり, CDDP+ENA 併用群 (ENA : 2.5 mg/kg) の生存率との間に有意な差が見られ, 死亡率には明確な ENA の用量依存性が確認された. CDDP+Low TEL 併用群の生存曲線を図 11B に示した. CDDP+Low TEL 併用群は 5 個体のうち day 6 に 2 個体, day 22 に 1 個体が死亡した. day 25 における生存率は 40%であり, CDDP+TEL 併用群 (TEL : 10 mg/kg) の生存率との間に差はみられなかった.

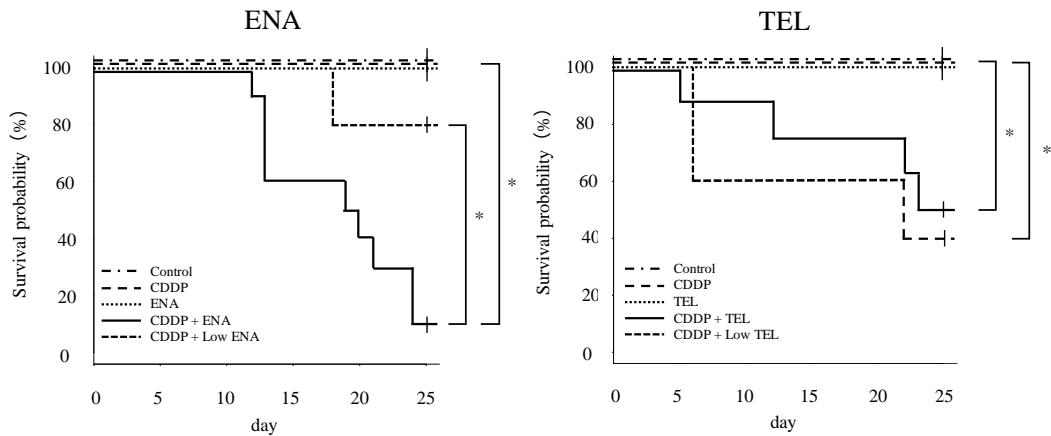


図 11 CDDP（反復投与）と ENA あるいは TEL の併用が生存率に与える影響（生存率）

BALB/c マウス（6 週齢, 雄性）を control 群 (n=5, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 7 mg/kg, 腹腔内投与), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=6, ENA : 1.25 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. (A) control 群, CDDP 単独群, ENA 単独群, CDDP+ENA 併用群および CDDP+Low ENA 併用群の day 25 までの生存率を算出した. 同様に, (B) control 群, TEL 単独群, CDDP 単独群, CDDP+TEL 併用群および CDDP+Low TEL 併用群の day 25 までの生存率を算出した. なお, 統計学的有意差は, log-rank 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

### 3.3.3. 死亡原因の調査

前項で記述したとように、ENA および TEL 併用群で死亡個体がみられた。死亡の原因として薬物代謝能の低下、その結果としての降圧薬の蓄積による致死的な血圧低下および/または腎機能障害を想定し、死亡した各個体の、血清中のアルブミン濃度、sBP および BUN の推移を確認した (図 12)。血清アルブミン濃度は全ての個体で基準値内であり、肝機能障害はなく、薬物代謝能は低下していないことが推測された。また、死亡直前に測定した sBP には致死的な低下はみられず、降圧薬の蓄積もないと示された。CDDP+ENA 併用群で 4 個体 (44%)、CDDP+Low ENA 併用群で 1 個体 (100%)、CDDP+TEL 併用群で 2 個体 (50%) および CDDP+Low TEL 併用群で 1 個体 (33%) に死亡直前に BUN の上昇がみられ、これらの個体は腎機能障害のために死亡したと考えられた。

生存個体について同様に確認した結果、血清アルブミン濃度および sBP に同様の傾向がみられた (図 13)。Day 25 において CDDP+ENA 併用群で 1 個体 (100%)、CDDP+Low ENA 併用群で 2 個体 (50%)、CDDP+TEL 併用群で 4 個体 (100%) および CDDP+Low TEL 併用群で 1 個体 (50%) に BUN の上昇がみられ、CDDP の投与をさらに継続すると、腎障害で致死する可能性が示された。

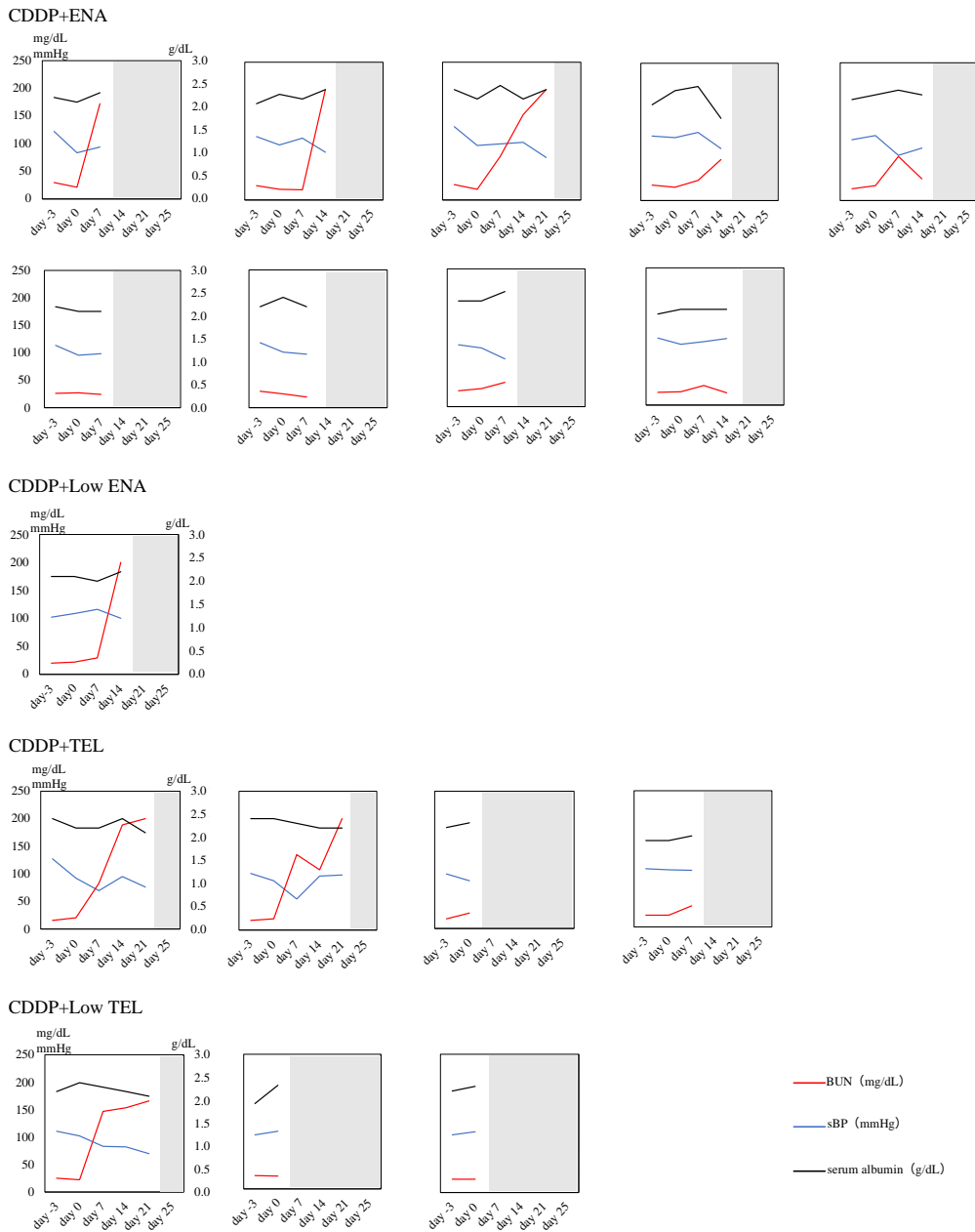
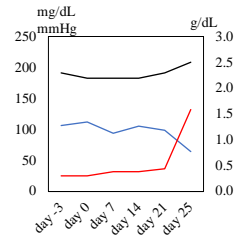


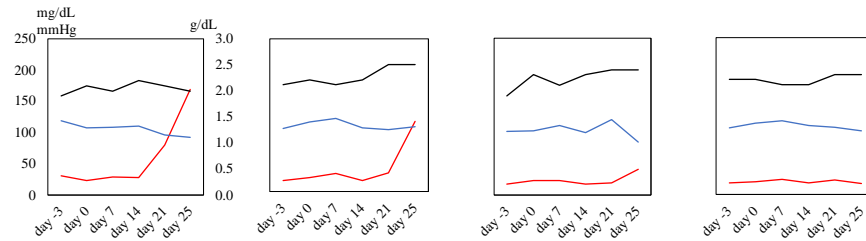
図 12 ENA および TEL 併用群 (死亡体) の BUN, sBP および血清アルブミン (ALB) の推移

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=6, ENA : 1.25 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. 各群の観察期間終了までに死亡した個体の BUN, sBP および ALB の推移を示した.

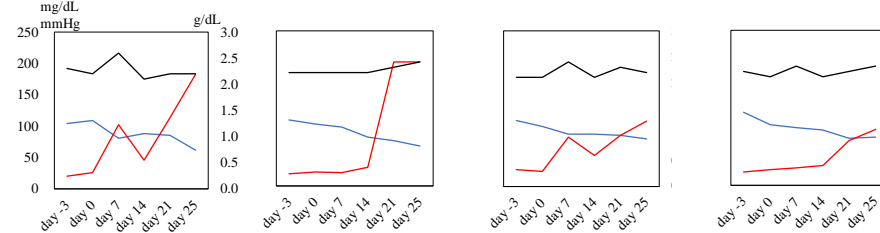
### CDDP+ENA



### CDDP+Low ENA



### CDDP+TEL



### CDDP+Low TEL



— BUN (mg/dL)  
— sBP (mmHg)  
— serum albumin (g/dL)

図 13 ENA および TEL 併用群 (生存個体) の BUN, sBP および血清アルブミン (ALB) の推移

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=6, ENA : 1.25 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. 各群の観察期間終了まで生存した個体の BUN, sBP および ALB の推移を示した.



#### 3.3.4. CDDP と低用量降圧薬の併用が腎機能マーカー（CRE および BUN）に及ぼす影響（CDDP 反復投与）

以上の結果から、ENA および TEL の併用によって死に至る最大の原因は、腎障害であることが示された。次に、ENA および TEL の減薬により、腎障害に及ぼす影響に差異が生じるか確かめるため、生存個体を用いて本章 3.3.1. と同様の方法で CRE および BUN を測定した。

Day 25 までの CRE を図 14A に示した。CDDP+Low ENA 併用群および CDDP+Low TEL 併用群は、day 7 および day 14 で CDDP 単独群と比較して CRE が増加する傾向がみられた。

Day 25 までの BUN を図 14B に示した。CDDP+Low ENA 併用群は、day 14 および day 25 で CDDP 単独群と比較して BUN が増加する傾向がみられた。CDDP+Low TEL 併用群は day 7 から day 25 にかけて CDDP 単独群と比較して BUN が増加する傾向がみられた。

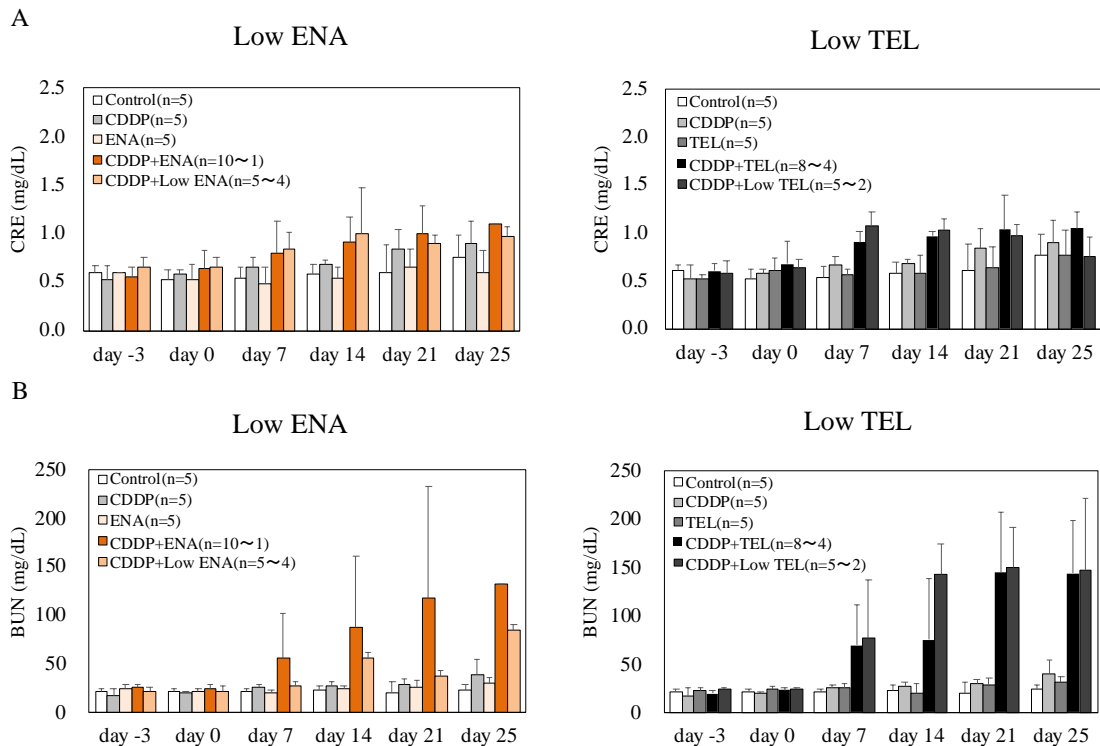


図 14 CDDP (反復投与), 各降圧薬あるいは CDDP と各降圧薬 (低用量) の併用が腎機能に与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=5, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 7 mg/kg, 腹腔内投与), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=6, ENA : 1.25 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. Day -3, day 0, day 7, day 14, day 21 および day 25 に採血を行い, (A) 血清クレアチニン (CRE) および (B) 血液尿素窒素 (BUN) を測定した.

### 3.3.5. CDDP と降圧薬の併用が線維化領域に及ぼす影響（反復投与）

第2章2.3.3.と同様に，降圧薬の併用によるCKDへの影響を組織学的に評価するため，屠殺時の腎組織のMasson trichrome染色を行い（図15A），腎間質面積に対する腎線維化面積の割合を算出した（図15B）．CDDP+TEL併用群，CDDP+ENA併用群，CDDP+Low TEL併用群およびCDDP+Low ENA併用群は，本章3.3.2.に記述したように死亡個体がみられたため，day 25まで生存した個体のみを解析対象とした．CDDP群はcontrol群および各降圧薬単独群と比較して腎線維化面積比が有意に増加した．CDDP+ENA併用群（ENA：2.5 mg/kg）およびCDDP+TEL併用群（TEL：10 mg/kg）の腎線維化面積比は，CDDP群と比較して増加傾向がみられた．

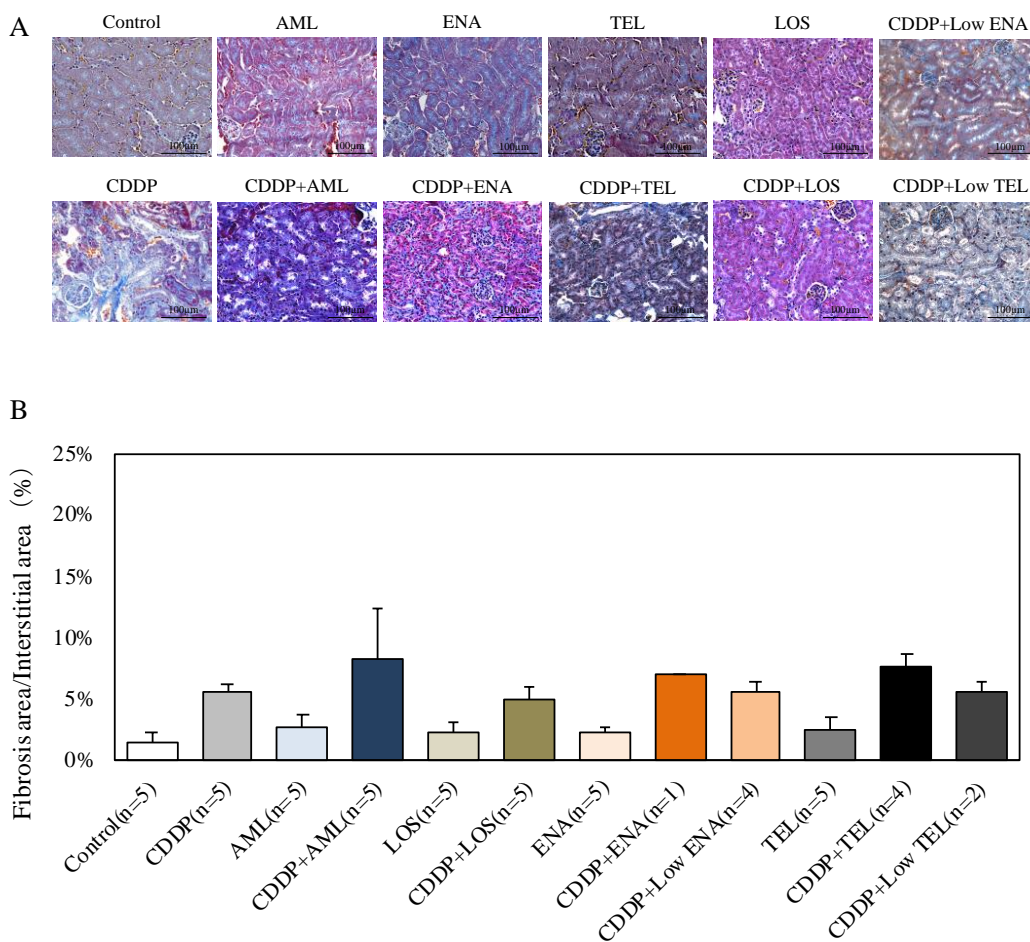


図 15 CDDP (反復投与), 各降圧薬あるいは CDDP と各降圧薬の併用が腎線維化に与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=5, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 7 mg/kg), AML 単独群 (n=5, AML : 5 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), CDDP+LOS 併用群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=5, ENA : 1.25 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. Day 25 に採取した腎臓からパラフィン切片を作製し, (A) Masson trichrome 染色を行った. 染色像から腎線維化領域を抽出し, (B) 各群の腎間質面積に対する線維化面積の割合を算出した.

なお, 本結果は観察期間終了時 (day 25) まで生存した個体を解析対象とした.

### 3.3.6. 上皮間葉転換への影響

前項に記述したように、CDDP を反復投与した場合、ENA あるいは TEL との併用により、腎線維化面積比が増加することが示された。次に、降圧薬の併用によって EMT が誘導されるか否かを検討するため、腎組織の $\alpha$ -SMA (図 16A) および上皮細胞の細胞接着分子である E-cadherin の免疫染色を行い、上皮間葉転換の程度について比較した。なお、前項と同様に死亡個体は解析対象から除外した。その結果、CDDP 単独群および CDDP+各降圧薬併用群では平滑筋細胞のマーカである $\alpha$ -SMA の染色領域が増加する傾向がみられた。特に CDDP+ENA 併用群 (ENA : 2.5 mg/kg) および CDDP+TEL 併用群 (TEL : 10 mg/kg) ではより強い増加傾向がみられた (図 16B)。一方、E-cadherin の染色領域にはそのような傾向は観察されなかった (結果非提示)。

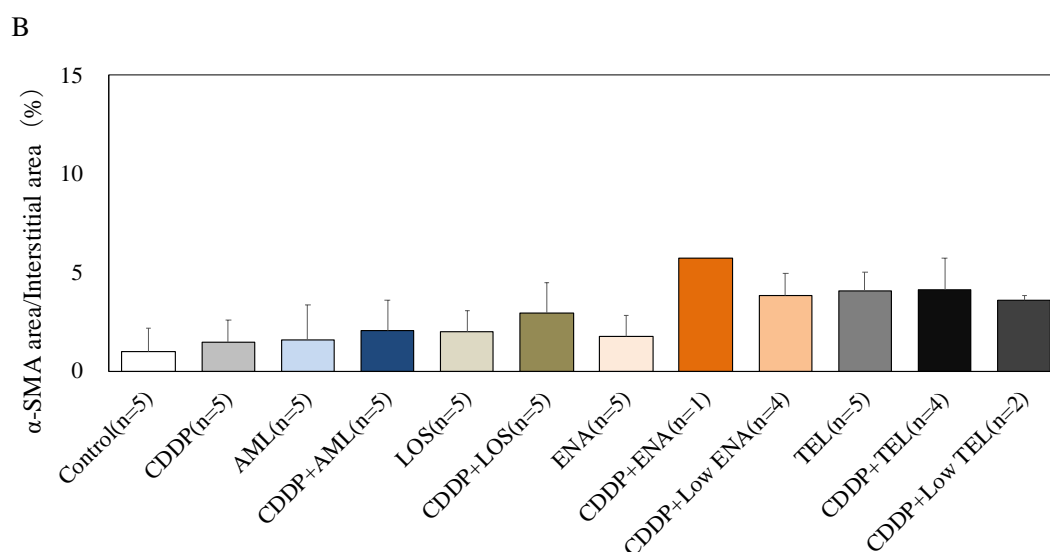
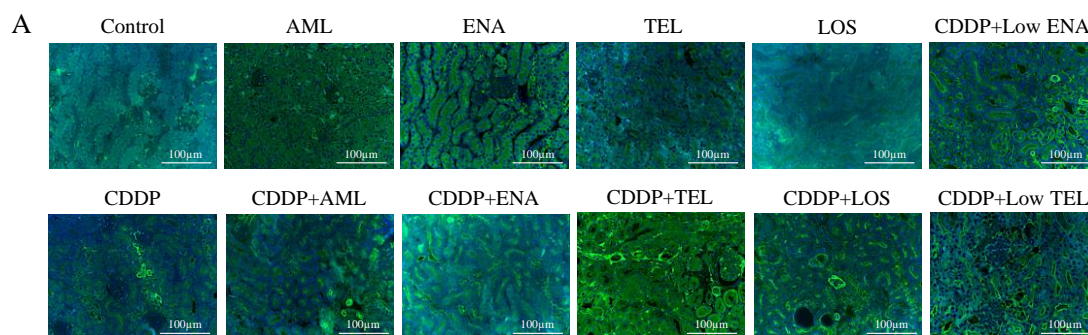


図 16 CDDP (反復投与), 各降圧薬あるいは CDDP と各降圧薬の併用が上皮間葉転換に与える影響

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を control 群 (n=5, 未処置), CDDP 単独群 (n=5, CDDP : 7 mg/kg), AML 単独群 (n=5, AML : 5 mg/kg), CDDP+AML 併用群 (n=5, AML : 5 mg/kg), LOS 単独群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), CDDP+LOS 併用群 (n=5, LOS : 10 mg/kg), ENA 単独群 (n=5, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=5, ENA : 1.25 mg/kg), TEL 単独群 (n=5, TEL : 10 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. Day 25 に採取した腎臓からパラフィン切片を作製し, (A) 抗  $\alpha$ -SMA 抗体による免疫染色を行った. 染色像から  $\alpha$ -SMA の染色領域を抽出し, (B) 各群の腎間質面積に対する  $\alpha$ -SMA の染色領域の割合を算出した.

なお, 本結果は観察期間終了時 (day 25) まで生存した個体を解析対象とした.

### 3.3.7. 腎線維化面積比と CRE, BUN あるいは $\alpha$ -SMA の染色領域の相関

以上の結果から, CDDP に ENA および TEL を併用すると死亡個体がみられ, その死亡原因の最大の要因が腎障害であることが示された. また, 本章 3.3.3. で生存個体でも腎障害で死亡する可能性が高い個体が存在することが示された. 次に, ENA および TEL の併用が腎障害を増悪する原因を調査するために, 生存個体 (CDDP+ENA : n=1, CDDP+Low ENA : n=4, CDDP+TEL : n=4, CDDP+Low TEL : n=2) で, 腎線維化面積比と CRE あるいは BUN との相関関係を調べた. その結果, 線維化面積比と CRE には有意な相関 ( $r=0.76, P<0.05$ ) がみられ, BUN との間には相関する傾向 ( $r=0.46, P=0.15$ ) がみられた (図 17). 次に, 腎線維化に EMT が関与しているか否かを確認するために, 腎線維化面積比と $\alpha$ -SMA の染色領域との相関関係を調べた. その結果, 線維化面積比と $\alpha$ -SMA の染色領域には有意な相関が見られた ( $r=0.67, P<0.05$ ) (図 18).

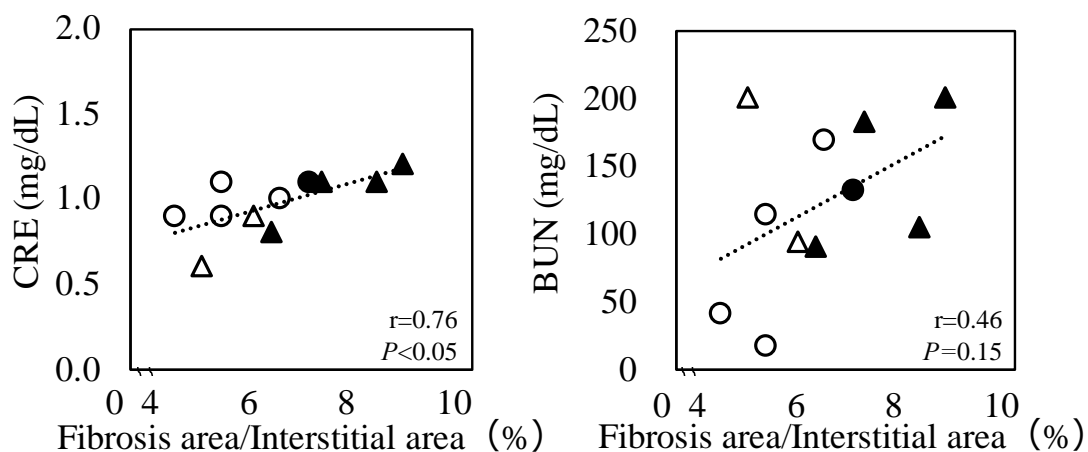


図 17 腎線維化面積比と腎機能マーカーの相関関係

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=6, ENA : 1.25 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. Day 25 の腎線維化面積の割合を算出し, 血清クレアチニン (CRE) あるいは血液尿素窒素 (BUN) との相関関係を調べた. 相関の統計学的有意性は, スピアマンの順位相関係数 (r) で表し,  $P < 0.05$  を有意な相関とした.

なお, 本結果は, 観察期間終了時まで生存した個体を解析対象とした. ●は CDDP+ENA 併用群, ○は CDDP+Low ENA 併用群, ▲は CDDP+TEL 併用群および△は CDDP+Low TEL 併用群を示す.



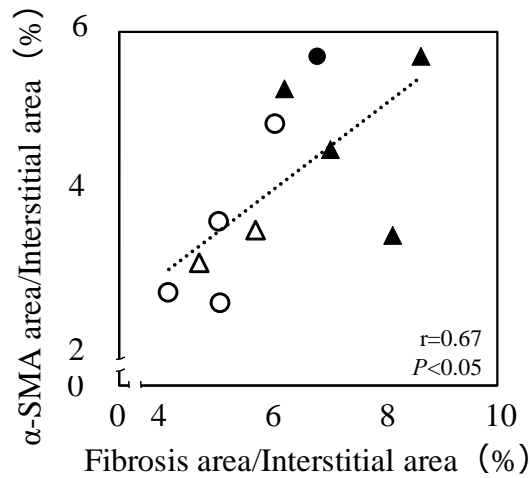


図 18 腎線維化面積比と $\alpha$ -SMA の染色領域の相関関係

BALB/c マウス (6 週齢, 雄性) を CDDP+ENA 併用群 (n=10, ENA : 2.5 mg/kg), CDDP+Low ENA 併用群 (n=6, ENA : 1.25 mg/kg), CDDP+TEL 併用群 (n=8, TEL : 10 mg/kg) および CDDP+Low TEL 併用群 (n=5, TEL : 5 mg/kg) に分けた. CDDP の初回投与日を 0 日目 (day 0) とし, 7 日間ごとに合計 4 回腹腔内投与した (day 0, day 7, day 14, day 21). 各降圧薬を CDDP 投与 3 日前 (day -3) から屠殺前日 (day 24) まで (週 6 回) 経口投与した. Day 25 の腎線維化面積および $\alpha$ -SMA の染色領域の割合を算出し, 互いの相関関係を調べた. 相関の統計学的有意性は, スピアマンの順位相関係数 (r) で表し,  $P<0.05$  を有意な相関とした.

なお, 本結果は, 観察期間終了時まで生存した個体を解析対象とした. ●は CDDP+ENA 併用群, ○は CDDP+Low ENA 併用群, ▲は CDDP+TEL 併用群および△は CDDP+Low TEL 併用群を示す.

### 3.4. 考 察

第2章で CDDP と RAS 阻害薬, 特に ENA および TEL の併用で CDDP 誘発性の AKI が増悪することが示された. 本章では CDDP を反復投与し, より臨床に近い環境で降圧薬を併用し CDDP 誘発性の CKD へ与える影響を調べた. その結果, CDDP と ENA または TEL を併用した場合に腎障害が増悪することが示された. TEL を併用した場合は, 併用しない場合と比較して BUN が有意に上昇しており, 第2章の結果と同様に, 使用した降圧薬の中でも, 特に TEL の併用が, より腎障害を増悪させることが示された. 以上の結果より, TEL の併用は CDDP 誘発性の AKI だけでなく, CKD も増悪させることが明らかになった.

CDDP を反復投与すると, CDDP+ENA 併用群および CDDP+TEL 併用群に死亡個体がみられたため, 死因に降圧薬の用量が関連しているか否かを確認するために, 併用する降圧薬を半量に減薬した. その結果, ENA では低用量と高用量で生存率に有意な用量依存性がみられた. また, TEL では生存率に差はなく, 用量依存性も認められなかった. 死亡の原因として薬物代謝能の低下や致死レベルの血圧低下が生じているかを調べた. しかし, 血清アルブミンは基準値内であり, 肝機能は正常であった. 死亡個体の死亡直前の sBP にも致死的な低下はみられなかった. 従って, 降圧薬の蓄積による血圧低下が死因ではないと考えられた. 死亡した17個体のうち, 8個体(47%)は死亡直前の BUN が上昇しており, 死亡個体の約半数は腎障害が原因で死亡したと考えられる.

TEL および ENA はヒトで有機アニオン輸送体 1B1 (OATP1B1, organic anion transporting polypeptides 1B1) または 1B3 で肝臓に取り込まれることが報告されている [59-63]. CDDP は腎基底膜に存在する有機カチオン輸送体 2 (OCT2, organic cation transporter type2) によって取り込まれ, 腎毒性を発現することが報告されている [39]. 一方で, CDDP が血中の炭酸塩と反応し負の錯体を形成することが示されており [64], TEL および ENA と同様の輸送体で肝臓に取り込まれることが報告されている [65]. 以上より, TEL または ENA によって肝臓で OATP1B1 または 1B3 の用量依存的な競合阻害が起こり, 結果として CDDP 腎基底膜の OCT2 による取り込みが促進され腎障害が増悪され死亡した可能性がある.

ENA および TEL の併用が腎障害を増悪する機序として, 腎線維化の促進を考え, 腎線維化面積と腎機能マーカーとの相関関係を調べた. 特に CRE と相関がみられたこと, BUN と相関する傾向がみられたことから, 腎線維化が腎機能障害の病態を反映することが示された. また, 腎線維化面積比と  $\alpha$ -SMA の染色領域に相関がみられたことから, EMT の誘導により腎線維化が促進された可能性が示された. 本研究では CDDP+ENA (2.5 mg/kg または 1.25 mg/kg) 併用群, CDDP+TEL

併用群は, CDDP 単独群と比較して $\alpha$ -SMA 領域の増加傾向がみられた. Kee ら [64] は生後 7 日目のラットに ENA を投与すると, 投与しない群と比較して, 腎組織の $\alpha$ -SMA 発現量が増加し, 膠原線維領域が有意に増加することを報告している. 本研究の ENA 併用群は $\alpha$ -SMA の染色領域と腎線維化領域がともに CDDP 単独群と比較して増加傾向にあり, 先行研究 [66] と一致する. また, ENA 単独群は control 群と比較すると,  $\alpha$ -SMA の染色領域および腎線維化領域が増加傾向を示している. 以上より, ENA 併用により EMT が誘導され, CDDP による腎線維化がさらに増悪した可能性が示された. 一方, TEL には本研究の結果とは相反する報告がある. Anju ら [67] はヒト免疫不全ウイルスによる腎障害の進展に EMT が関与しており, モデルマウスの皮下に TEL が充填された浸透圧ポンプを埋め込み, 持続的に TEL を投与すると $\alpha$ -SMA の発現量が TEL 非投与マウスと比較して有意に減少したと報告している. このような TEL の EMT 抑制作用はペルオキシソーム増殖剤活性化受容 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activating receptor gamma) の活性化によるものと考えられている [68]. ただし, これらの報告は前述のように持続的に TEL が投与されているか, 細胞に直接 TEL による刺激が加えられている報告であり, 臨床への反映は非現実的である. 事実, Ilse ら [69] は TEL の PPAR $\gamma$ 活性化作用は用量依存的であり, ヒトでは 80 mg または 160 mg の TEL を投与しても PPAR $\gamma$ の標的遺伝子である CD163 の発現量がプラセボ群と有意差がないことを報告している. さらに, Netanya ら [70] は AIDS 患者を対象に, 抗レトロウイルス治療に TEL を追加しても脂肪組織の線維化は抑制されないことを報告している. また, ヒトにおいて通常用量の TEL (40 mg) を経口投与した時の生物学的利用率は 42.4%と報告されている [71]. 本研究では TEL 単独群では, 10 mg/kg の TEL を経口投与したが, 以上の理由から, EMT を抑制できるほどの用量ではなかったと考えられる. 本研究では, これまでの報告とは異なり, TEL が EMT を誘導するような結果を示しているが, 同様の報告はこれまでにない. また, TEL 単独群でも $\alpha$ -SMA の染色領域の増加傾向がみられたが, 腎線維化領域には増加傾向がみられず, 結果に乖離がある. 今後, TEL 単独群で用量を細分化し, EMT の誘導作用が変化するか否かを確認する必要がある. 一方, CDDP をラットに投与すると, 投与しない場合と比較して $\alpha$ -SMA 発現量が有意に増加すること [72], CDDP が腫瘍関連マクロファージを刺激することで腫瘍細胞の遊走を促進し, EMT を引き起こすことが報告されている [73, 74]. これより, ENA または TEL の併用が CDDP による EMT の誘導を促進させ, 腎線維化を増悪させる可能性が示された.

以上, CDDP 誘発性の CKD においても, 第 2 章と同様に RAS 阻害薬と CDDP との併用で腎障害を増悪させる可能性が示された. また, RAS 阻害薬の中でも ENA と TEL が腎障害をより強く増悪させる可能性を見出した. 腎障害を増悪させる原因

としてEMT誘導による,CDDPの腎線維化の増強が関与している可能性を示した.

## 総括

本研究で得られた成果は以下の通りである。

CDDP は現在も多くのがん種に汎用されており，その治療強度を下げることは原疾患の治療を妨害し，患者の予後に著しい低下をもたらす．CDDP と RAS 阻害薬の併用により，CDDP 誘発性の AKI および CKD が増悪する可能性を示し，RAS 阻害薬の中でも，ENA および TEL は特に腎障害を増悪させることを示した．さらに，CDDP による腎障害と血圧低下に相関がないことを明らかにし，腎障害を増悪させる要因として，ENA および TEL が EMT を誘導し腎線維化促進する可能性を示した．本研究では，RAS 阻害薬が CDDP 誘発性の腎障害に与える影響について一定の方向性を示した．

以上，本研究により，大規模臨床研究の必要性を明確に示せる基礎的所見が集積でき，CDDP の治療強度を下げないレジメン設計への一助とすることができた．

## 謝 辞

本研究の遂行において、終始御懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました、独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター 薬剤部 元薬剤部長 政道修二先生に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行において、有益なご助言とご指導を頂きました、独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部 元臨床研究部長 佐伯 行彦先生ならびに、同臨床研究部 現臨床研究部長 大島至郎先生に厚く御礼申し上げます。

摂南大学大学院で学ぶ機会を与えてくださいました本学元教授 故 藤多哲朗先生に謹んで御礼申し上げます。

研究遂行に協力くださった摂南大学薬学部 病態医科学研究室の諸氏に深く感謝致します。

## 引用文献

1. 平成 29 年 (2017) 患者調査の概況, 厚生労働省, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/index.html>
2. がん薬物療法時の腎障害診療ガイドライン 2016, ライフサイエンス出版株式会社, 2016 年 6 月.
3. Latcha S., Jaimes EA., Patil S., Glezerman IG., Mehta S., Flombaum CD., 2016. Long-term renal outcomes after cisplatin treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* **11**, 1173-1179.
4. Cvitkovic E., Spaulding J., Bethune V., 1977. Improvement of cis-dichlorodiammine platinum(NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer.* **39**, 1357-61.
5. ランダ注, 医薬品インタビューフォーム, 日本化薬株式会社, 2018 年 (第 18 版).
6. de Jongh FE., van Veen RN., Veltman SJ., de Wit R., van der Burg ME., van den Bent., MJ, Planting AS., Graveland WJ., Stoter G., Verweij J., 2003. Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer.* **88**, 1199-1206.
7. 堀田勝幸, 二宮貴一郎, 近藤征史, 山根由紀, 浦田佳子, 里内美弥子, 赤松弘朗, 瀬戸貴司, 山本信之, 2015. シスプラチン投与におけるショートハイドレーション法の手引き.
8. Horinouchi H., Kubota K., Itani H., Taniyama T., Nakamichi S., Wakui H., Kanda S., Nokihara H., Yamamoto N., Sekine I., Tamura T., 2013. Short Hydration in Chemotherapy Containing Cisplatin ( $\geq 75$  mg/m<sup>2</sup>) for Patients with Lung Cancer: A Prospective Study., *Japanese journal of clinical oncology.* **43**, 1105-9.
9. Pabla N., Dong Z., 2008. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International*, **73**, 994-1007
10. Perazella MA., Moeckel GW., 2010. Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy. *Semin Nephrol.* **30**, 570-81.
11. Neife AG., Maria AC., Nadia MM., Antonio C., 2012. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch*

- Toxicol.* **86**, 1233-1250.
12. Luke DR., Vadiiei K., Lopez-Berestein G., 1992. Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* **7**, 1-7.
  13. Hye KM., Abdul SM., Abdullah NA., Johns EJ., 2017. Cisplatin-induced nephrotoxicity causes altered renal hemodynamics in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats: role of augmented renal alpha-adrenergic responsiveness. *Exp Toxicol Pathol.* **59**, 253-260.
  14. Arora P., Rajagopalam S., Ranjan R., Kolli H., Singh M., Venuto R., Lohr J., 2008. Preoperative Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers Is Associated with Increased Risk for Acute Kidney Injury after Cardiovascular Surgery. *Clin J Am Soc Nephrol.* **3**, 1266-1273.
  15. Plataki M., Kashani K., Cabello GJ., Maldonado F., Kashyap R., Kor DJ., Gajic O., Rodrigo CC., 2011. Predictors of acute kidney injury in septic shock patients:an observational cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol.* **6**, 1744-1751.
  16. Suh SH., Kim CS., Choi JS., Bae EH., Ma SK., Kiml SW., 2013. Acute kidney injury in patients with sepsis and septic shock:risk factors and clinical outcomes. *Yonsei Med J.* **54**, 965-972.
  17. Molinas SM., Gonzalez CC., Bobadilla CY., Monasterolo LA., Cruz C., Elias MM., Bobadilla NA., Trumper L., 2009. Effects of losartan pretreatment in an experimental model of ischemic acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* **112**, e10-19.
  18. Brar S., Ye F., James MT., Hemmelgarn B., Klarenbach S., Pannu N., 2018, Association of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor or Angiotensin Receptor Blocker Use With Outcomes After Acute Kidney Injury. *JAMA Intern Med*, **178**, 1681-1690.
  19. 高血圧治療ガイドライン 2019, 日本高血圧学会, 2019年4月.
  20. Komaki K., Kusaba T., Tanaka M., Kado H., Shiotsu Y., Matsui M., Shiozaki A., Nakano H., Ishikawa T., Fuzaiwara H., Konishi H., Itoh Y., Matoba S., 2017. Lower blood pressure and risk of cisplatin nephrotoxicity: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* **17**, 144-151.



21. Saleh S., Ain-Shoka AA., El-Demerdash E., Khalef MM., 2009. Protective effects of the angiotensin II receptor blocker losartan on cisplatin-induced kidney injury. *Chemotherapy*. **55**, 399-406.
22. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v4.0, National cancer institute, 2010. June 14.
23. 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針, 厚生労働省, 平成 26 年 12 月 22 日 (平成 29 年 2 月 28 日一部改正).
24. Barrera CJ., Pérez VR., Rodríguez RR., Reyna J, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA., 2013. Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. **83**, 93-103.
25. Liu J., Sun G., He Y., Song F., Chen S., Guo Z., Liu B., Lei L., He L., Chen J., Tan N., Liu Y., 2019. Early beta-blockers administration might be associated with a reduced risk of contrast-induced acute kidney injury in patients with acute myocardial infarction. *J Thorac Dis*. **11**, 1589-1596.
26. Kang H., Hong SH., 2019. Risk of Kidney Dysfunction from Polypharmacy among Older Patients: A Nested Case-Control Study of the South Korean Senior Cohort. *Scientific Reports*. **9**, Article number: 10440.
27. Chao CT., Tsai HB., Wu CY., Lin YF., Hsu NC., Chen JS., Hung KY., 2015. Cumulative Cardiovascular Polypharmacy Is Associated With the Risk of Acute Kidney Injury in Elderly Patients. *Medicine*. **94**, e1251.
28. Ameen., Kashif MA., Sumreen., 2016. To compare anti-albumin urea effects of valsartan alone with combination of valsartan and amlodipine in patients of chronic kidney disease. *Pak J Med Sci*. **32**, 613-616.
29. Zamani Z., Nematbakhsh M., Fatemeh EJ., Talebi A., Jilanchi S., Navidi M., Shirdavani S., Ashrafi F., 2016. Effect of enalapril in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats; gender-related difference. *Adv Biomed Res*. Published online, doi: 10.4103/2277-9175.175253.
30. Rani N., Bharti S., Tomar A., Dinda AK., Arya DS., Bhatia J., 2016. Inhibition of PARP activation by enalapril is crucial for its renoprotective effect in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *ee Radic Res*. **50**, 1226-1236.

31. 厚生労働省 第3回 NDB オープンデータ ,  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000177221\\_00002.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000177221_00002.html).
32. Kanematsu Y., Kanematsu M., Kurihara C., Tsou TL., Nuki Y., Liang EI., Makino H., Hashimoto T., 2010. Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension*. **55**, 1267-1274.
33. Lu H., Balakrishnan A., Howatt DA., Wu C., Charnigo R., Liao G., Cassis LA., Daugherty A., 2012. Comparative Effects of Different Modes of Renin Angiotensin System Inhibition on Hypercholesterolaemia-Induced Atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. **165**, 2000-2008.
34. Washida K., Ihara M., Nishio K., Fujita Y., Maki T., Yamada M., Takahashi J., Wu X., Kihara T., Ito H., Tomimoto H., Takahashi R., 2010. Nonhypotensive dose of telmisartan attenuates cognitive impairment partially due to peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. **41**, 1798-1806.
35. Graus-Nunes F., Santos FO., Marinho TS., Miranda CS., 2019. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V. Beneficial effects of losartan or telmisartan on the local hepatic renin-angiotensin system to counter obesity in an experimental model. *World J Hepatol*. **11**, 359-369.
36. Xia H., Feng Y., Obr TD., Hickman PJ., Lazartigues E., 2009. Angiotensin II type 1 receptor-mediated reduction of angiotensin-converting enzyme 2 activity in the brain impairs baroreflex function in hypertensive mice. *Hypertension*. **53**, 210-216.
37. Pei Ma., Sen Zhang., Xinlin Su., Guixing Qiu., Zhihong Wu., 2015. Protective effects of icariin on cisplatin-induced acute renal injury in mice. *Am J Transl Res*, **7**, 2105-2114.
38. Sasaki S., Takahashi T., Hagiwara A., Tsujimoto H., Osaki K., 1995. Acute toxicity of cisplatin microcrystals suspended in oil on intraperitoneal administration in mice. *Drug Delivery System*. **10**, 111-114.
39. Abuelo JG., 2007. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med*, **357**, 797-805.
40. Yoshitake I., Sezai A., Shino M., 2014. The recent trends in the use of angiotensin II receptor blockers. *J Nihon Univ Med Ass*. **73**, 8-11.

41. Chachin M., Ohmura T., Hayashi N., Nishimura Y., Satoh H., 2004. Pharmacological and clinical profile of telmisartan, a selective angiotensin II type-1 receptor blocker. *Folia Pharmacol.* **124**, 31-39
42. Summers C., Peluso AA., Haugaard AH., Bertelsen JB., Steckelings UM., 2019. Anti-fibrotic mechanisms of angiotensin AT 2-receptor stimulation. *Acta Physiol.* **227**:e13280.
43. Al-Husseiny F., Sobh MA., Ashour RH., Foud S., Medhat T., El-Gilany AH., Elghannam D., Abdel-Ghaffar H., Saad MA., Sobh M., 2016. Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells cut short the acuteness of cisplatin-induced nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Int J Stem Cells.* **9**, 70-78.
44. Hayashi K., Nagahama T., Oka K., Epstein M., Saruta T., 1996. Disparate effects of calcium antagonists on renal microcirculation. *Hypertens Res.* **19**, 31-36.
45. Isabelle OJC., Avner MAB., Yuri NFB., Krissia BD., Gerly AC Brito., Marcos RF., 2017. Study of the protective effect of dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira.* **32**, 873-880.
46. Rena RW., Wei L., Thomas AW., Monika S., William CK., Alain GB., James OH., Frederick LB., Anne P., Lynne W., 2011. Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* **4**, 1481-1486.
47. Imai Y., Sato K., Abe K., Sasaki S., Nihei M., Yoshinaga K., Sekino H., 1986. Effect of weight loss on blood pressure and drug consumption in normal weight patients, *Hypertension.* **8**, 223-8.
48. Miller RP., Tadagavadi RK., Ramesh G., Reeves WB., 2010, Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins,* **2**, 2490-2518.
49. Terada Y., Inoshita S., Kuwana H., Kobayashi T., Okado T., Ichijo H., Sasaki S., 2008. Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemic acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun.* **364**, 1043-1049.
50. Kuwana H., Terada Y., Kobayashi T., Okado T., Penninger JM., Irie-Sasaki J., Sasaki T., Sasaki S., 2008. The phosphoinositide-3 kinase gamma-Akt pathway mediates renal tubular injury in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* **73**, 430-445.

51. Kubota K., Watanabe K., Kunitoh H., Noda K., Ichinose Y., Katakami N., Sugiura T., Kawahara M., Yokoyama A., Yokota S., Yoneda S., Matsui K., Kudo S., Shibuya M., Isobe T., Segawa Y., Nishiwaki Y., Ohashi Y., Niitani H., 2004. Phase III Randomized Trial of Docetaxel Plus Cisplatin Versus Vindesine Plus Cisplatin in Patients With Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: The Japanese Taxotere Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* **22**, 254-261.
52. Wright JR., Duggal A., Thomas R., Reeve R., Roberts IS., Kalra PA., 2001, Clinicopathological correlation in biopsy-proven atherosclerotic nephropathy: implications for renal functional outcome in atherosclerotic renovascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* **16**, 765-70.
53. Kuma A., Tamura M., Otsuji Y., 2016, Mechanism of and Therapy for Kidney Fibrosis, *J UOEH.* **38**, 25-34.
54. LeBleu VS., Taduri G., O'Connell J., Teng Y., Cooke VG., Woda C., Sugimoto H., Kalluri R., 2013. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* **19**, 1047-1053.
55. Liu Y., 2004. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol.* **15**, 1-12.
56. Kalluril R., Robert AW., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* **119**, 1420-1428.
57. Jang HC., Hye MR, Eun JO., Ju MY., Ji SA., Hee YJ., Ji YC., Sun HP., Yong LK., Ihm SK., Chan DK., 2016. Alpha1-Antitrypsin Attenuates Renal Fibrosis by Inhibiting TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition. *PLoS ONE.* **11**, e0162186.
58. Cierra NS., Mark AD., Tess VD., Parag PS., Marimuthu S., Deanna S., Gavin A., Judit M., Levi JB., Leah JS., 2016. Repeated administration of low-dose cisplatin in mice induces fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* **310**, 560-568.
59. Yamada A., Maeda K., Kamiyama E., Sugiyama D., Kondo T., Shiroyanagi Y., Nakazawa H., Okano T., Adachi M., John DS., Adachi Y., Zhuohan Hu., Kusuhara H., Sugiyama Y., 2007. Multiple Human Isoforms of Drug Transporters Contribute to the Hepatic and Renal Transport of Olmesartan, a Selective Antagonist of the Angiotensin II AT1-Receptor. *Drug Metab Dispos.* **35**, 2166-2176.

60. Yamashiro W., Maeda K., Hirouchi M., Adachi Y., Zhuohan Hu., Sugiyama Y., 2006. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos.* **34**, 1247-1254.
61. Ishiguro N, Maeda K., Kishimoto W., Sugiyama Y., 2006. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos.* **34**, 1109-1115.
62. Lichuan L., Yunhai C., Alfred YC., Shitara Y, Sugiyama Y., 2006. Dietrich Keppler and K. Sandy Pang, Vectorial Transport of Enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in Rat and Human Livers *J Pharmacol Exp Ther.* **318**, 395-402.
63. Lei T., Hong L., Shuang X., Juanjuan J., Lulu H., Yiling H., Yishi L., 2011. Effect of organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphism on the single- and multiple-dose pharmacokinetics of enalapril in healthy Chinese adult men. *Clin Ther.* **33**, 655-63.
64. Corey R. Centerwall, Jerry Goodisman, Deborah J. Kerwood, and James C. Dabrowiak., 2005. Cisplatin Carbonato Complexes. Implications for Uptake, Antitumor Properties, and Toxicity. *J Am Chem Soc.* **127**, 12768-12769.
65. Cynthia SL., Jason AS., Aisha LW., Shuiying H., Alice AG., Alex S., 2013. Modulation of OATP1B-type transporter function alters cellular uptake and disposition of platinum chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther.* **12**, 1537-44.
66. Kee HY., Hyung EY., Eun SB., Young SH., 2019. Angiotensin inhibition in the developing kidney; tubulointerstitial effect. *Pediatric Research.* **85**, 724-730.
67. Anju Y., Sridevi V., Dileep K., Guohua D., Douglas NC., Praveen NC., Pravin C., 2010. HIVAN phenotype: consequence of epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Am J Physiol Renal Physiol.* **298**, 734-744.
68. Yumin C., Qiong L., Zibo X., Wei L., Li C., Zuying Xi., 2012. Telmisartan counteracts TGF- $\beta$ 1 induced epithelial-to-mesenchymal

- transition via PPAR- $\gamma$  in human proximal tubule epithelial cells. *Int J Clin Exp Pathol.* **5**, 522-529.
69. Ilse NB., Patrizia T., Janine K., Renee GS., Julia S., Thomas U., Kai K., Jürgen S., Klaus GP., Ulrich K., 2011. High-Dose Treatment With Telmisartan Induces Monocytic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Target Genes in Patients With the Metabolic Syndrome. *Hypertension.* **58**, 725-732.
70. Netanya SU., Douglas WK., Eunice Y., Carl JF., Michael ML., Jacob DE., Claire D., Clara M., Scott DN., Karen LK., Barbara B., Amneris EL., Grace AM., Daniel CD., Judith SC., Jordan EL., 2018. Telmisartan Therapy Does Not Improve Lymph Node or Adipose Tissue Fibrosis More Than Continued Antiretroviral Therapy Alone. *J Infect Dis.* **217**, 1770-1781.
71. Joachim S., CAPF Su., W Roth., 2000. Pharmacokinetics of Orally and Intravenously Administered Telmisartan in Healthy Young and Elderly Volunteers and in Hypertensive Patients. *J Int Med Res.* **28**, 149-67.
72. XW Li., Feng LX., Zhu XJ., Liu Q., Wang HS., Wu X., Yan P., Duan XJ., Xiao YQ., Cheng W., Peng JC., Zhao F., Deng YH., Duan SB., 2019. Human umbilical cord blood mononuclear cells protect against renal tubulointerstitial fibrosis in cisplatin-treated rats. *Biomed Pharmacother.* doi: 10.1016/j.biopha.2019.109310.
73. Milad A., Ali Z., Kiavash H., Mahshad K., Reza M., Tahereh J., Gautam S., 2020. Association of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) with Cisplatin Resistance. *Int J Mol Sci.* **21**, 4002-4048.
74. Wan Liu., Wang W., Wang X., Xu C., Zhang N., Di W., 2020. Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis. *Cancer Lett.* **472**, 59-69.