

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591015

研究課題名（和文） シスプラチン誘発ラット急性腎不全モデルに対する脂肪酸乳剤の効果に関する研究

研究課題名（英文） The effects of fatty acid emulsion for cisplatin-induced acute renal failure in rats.

研究代表者

中村 典雄 (NAKAMURA NORIO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60332657

研究成果の概要（和文）：本研究において、n-3系多価不飽和脂肪酸である Eicosapentaenoic acid(EPA)、Docosahexaenoic acid(DHA)の静注可能な乳剤を作成し、シスプラチン誘発ラット急性腎不全モデルへの効果を検討した。結果は有意な腎不全抑制効果を認めなかった。しかし他の腎炎モデルに投与試みたところ、ラット馬杉腎炎モデルにおいて尿蛋白抑制効果が認められた。この結果より、脂肪酸乳剤の腎疾患治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created an infusible emulsion of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and investigated the effect of the emulsion against cisplatin-induced acute renal failure model of rats. However, there were no beneficial effect of the emulsion in the model. We also investigated the effect of DHA emulsion against nephrotoxic serum nephritis model of rats. After the administration of the emulsion, the levels of protein excretion of urine were decreased in the rats. These results suggest that DHA emulsion might be beneficial effects for the renal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

急性腎不全の死亡率は、現在様々な治療薬が使用されているにも関わらず、未だ25～75%と高率となっている。急性腎不全の原因として、その多くが薬剤を誘因として発症すると考えられている。その中でも比較的良好に知られているのが抗癌剤のひとつである CDDP である。CDDP は強力な抗癌作用を有し様々な悪性腫瘍の治療に用いられているが、副作

用として腎毒性が知られており、使用の際には十分注意が必要である。このメカニズムは現在明らかとなっていないが、一部は酸化ストレスの関与も考えられている。従って CDDP の腎毒性の病態を解明することは、CDDP の抗癌剤としての使用に際して有用であるだけでなく、薬剤による急性腎不全の病態解明においても役立つものと考えられる。

一方、1970年代のDyerberg、Bangらによるグリーンランドにおける疫学調査に端を発した魚油の研究により、魚油の主成分であるエイコサペンタエン酸(Eicosapentaenoic acids; EPA)、ドコサヘキサエン酸(Docosahexaenoic acids; DHA)に代表されるn-3系多価不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids; PUFA)が、血小板凝集抑制作用、血管拡張作用、抗炎症作用、免疫抑制作用などを介して動脈硬化性疾患、慢性炎症性疾患に対して効果を有することが示されてきた。n-3系PUFAは、様々な疾患に対する治療薬として投与が試みられており、腎疾患においては、慢性腎炎の代表であるIgA腎症に、n-3系PUFAを多量に含有している魚油を経口投与して、腎機能の悪化を抑制することが、大規模介入試験にて報告されてきた。しかし近年、その効果については異論もあり、意見の一致をみていない。これは、経口投与では魚油の効果の発現は緩やかであり、このために、研究対象となった患者群の病勢の程度によっては、魚油投与が無効であるとの報告もみられるからである。この問題を解決するためには、我々はn-3系PUFAの静注可能な乳剤の開発が必要であると考えに至った。乳剤として静注することによって、経口投与に比較して、より短時間で血中および組織中の濃度を上昇させることが可能になると思われ、より強力な作用、より短時間での作用発現が期待できると考えられるからである。また、乳剤の開発により、対象となる病態も、慢性疾患だけではなく慢性疾患の急性増悪期や急性疾患にまで広がると考えられる。以上の知見を背景とし、本研究の目的は、n-3系PUFAの一種であるEPA、DHAの乳剤を開発し、急性腎不全のモデルであるCDDP誘発急性腎不全ラットに投与することにより、その発症と進展の抑制効果を検討することである。現在まで検討されていなかった魚油の急性疾患に対する効果について検討することにより、魚油乳剤の治療薬としての可能性を模索する。

2. 研究の目的

今回の我々の目的は、魚油の主成分であるn-3系PUFAの高純度乳剤を作製して、急性腎不全モデルであるCDDP誘発急性腎不全ラットに投与して、その効果を検討することである。n-3系PUFA乳剤は、元来生体内に多量に存在する脂肪酸であるため、重篤な副作用の可能性は低いと考えられる。また以前から報告されているとおり、脂肪酸乳剤は炎症巣に選択的に取り込まれて、また持続的に作用すると考えられているため、Drug delivery systemの観点からも有用性が高いと考えられる。このような点から、n-3系

PUFA乳剤は治療薬として、有用性が高いに期待されると考えられる。

3. 研究の方法

(1) EPA、DHA乳剤の作製

鯛の可食部より油脂を抽出し、 -70°C にて結晶化し飽和脂肪酸を分離した。残りの多価不飽和脂肪酸に富むトリグリセライド(TG)をメチル化した後、高速液体クロマトグラフィーにてEPAメチルエステル分画を採取した。これを水解して得られたfree EPAとグリセオールを反応させてEPA-TGを得た。このEPA-TGの純度は95%以上であった。EPA-TGを0.2%の α トコフェロールと卵黄レシチンとともにGeyerらの方法で乳化しEPA乳剤を作成した。この組成は、100mL当たりEPA-TGが10g、卵黄レシチンが1.2g、グリセオールがであった。

同様の方法にてDHA乳剤を作製した。なお対照として用いるダイズ油乳剤も同様の方法にて作製した。

(2) CDDP誘発ラット急性腎不全モデルおよびラット馬杉腎炎モデルの作製

CDDP(日本化薬、東京)を生理的食塩水で溶解し、SDラットへ7mg/kg腹腔内投与することにより急性腎不全が誘発された。馬杉腎炎モデルは、既報に基づいて馬杉抗体を作成し、これをウイスターラットに投与して馬杉腎炎モデルを作成した。

(3) CDDP誘発ラット急性腎不全モデルにおけるEPA乳剤およびDHA乳剤の腎不全抑制効果の検討

6週齢(体重約200g)の雄のSDラット18匹をEPA群、ダイズ油群、生理食塩水群に分け、EPA群には2mL(10mL/kg)のEPA乳剤を、ダイズ油群にはEPA乳剤と同様の方法で作成したダイズ油乳剤を2mL(10mL/kg)、生理的食塩水群には生理的食塩水を2mL(10mL/kg)腹腔内投与した。24時間後7mg/kgのCDDPを静注し、引き続きEPA、ダイズ油、生理的食塩水を連日5日間投与した。すなわちこれらは急性腎不全誘発24時間前より連日6日間投与となった。ラットは代謝ケージで飼育して蓄尿し尿を採取し、CDDP投与5日後に屠殺し採血および腎を採取した。

次に、DHA乳剤を用いて同様にCDDP誘発ラット急性腎不全モデルにおける腎不全抑制効果を検討した。

一方、馬杉腎炎モデルは、6週齢のウイスターラットを用いて、同様な実験計画で行った。乳剤投与24時間後に馬杉腎炎抗体を尾静脈より静注し、引き続き連日乳剤を投与して、蓄尿し尿を採取した。抗体投与5日後に屠殺

し採血および腎を採取した。

(4) 組織学的検討

採取した腎組織をホルマリン固定して、組織学的検討を行った。また蛍光抗体法により補体、免疫グロブリン等の沈着についても検討した。

(5) 血漿および腎組織の脂肪酸分析

採取した血漿は、Folch らの方法で総脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより、リン脂質、中性脂肪、遊離脂肪酸の3分画に分け、メチル化した後ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸分析を行った。腎組織の脂肪酸分析も、同様に行った。具体的には、腎組織をホモジネートした後、総脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーでリン脂質を分離、採取し、メチル化後ガスクロマトグラフィーにて測定した。

(6) 統計処理

データは平均±標準誤差で示した。多群間の比較は Scheffe's method を用い、 $p < 0.05$ より有意とした。

4. 研究成果

(1) EPA 乳剤の CDDP 誘発ラット急性腎不全モデルに対する効果について

CDDP 投与 5 日目の屠殺時の血漿 Cr 値を、EPA 投与群(n=6)、ダイズ油投与群(n=6)、生理的食塩水投与群(n=4)の 3 群間で比較したところ、それぞれ、 1.86 ± 0.01 mg/dL, 1.76 ± 0.29 mg/dL, 2.69 ± 0.41 mg/dL であり、統計学的に有意差は認めなかった。

(2) DHA 乳剤の CDDP 誘発ラット急性腎不全モデルに対する効果について

CDDP 投与 5 日目の屠殺時の血漿 Cr 値を DHA 投与群(n=9)、生理的食塩水投与群(n=9)の 2 群間で比較したところ、それぞれ、 1.46 ± 0.19 mg/dL, 1.68 ± 0.23 mg/dL であり統計学的有意差は認めなかった。

(3) DHA 乳剤のラット馬杉腎炎モデルに対する効果について

生理的食塩水投与群に比較して DHA 乳剤投与群では尿蛋白排泄量が有意に低値を示した (35.0 ± 13.3 vs. 79.2 ± 11.8 mg/day on day, $p < 0.05$)。また腎リン脂質分画の脂肪酸分析では、DHA 投与群では他の群と比較して DHA、EPA の有意な上昇が、アラキドン酸の有意な低下が認められた。血漿脂肪酸分析の結果では、リン脂質分画、遊離脂肪酸分画では大きな脂肪酸の変化は認めなかったが、中性脂肪分画においては、DHA、EPA の有意な上昇が認められた。組織学変化はそれぞ

れの群で有意な相違はみられなかった。

以上の結果より、今回我々が作製した n-3 系 PUFA 乳剤 (EPA 乳剤、DHA 乳剤) の評価としては、当初の目的であった CDDP 誘発ラット急性腎不全モデルにおける腎不全抑制効果は残念ながら認められなかった。しかし他の疾患モデル (Thy1.1 腎炎モデル、ピューロマイシンネフローゼモデル、馬杉腎炎モデル) について検討したところ、馬杉腎炎モデルにおいて、DHA 乳剤が尿蛋白抑制効果を示すことが明らかとなった。この結果より、今後馬杉腎炎への効果について、より詳細に検討し、臨床応用への可能性も検討したいと考えている。

なお、CDDP 誘発急性腎不全モデルに関しても、今回は有意差は認めなかったが、血漿 Cr 値の上昇を若干抑制する傾向は確認された。従って、今後、脂肪酸乳剤の投与量、投与のタイミングなどについて改めて検討したいと考えている。

n-3 系多価不飽和脂肪酸の炎症性疾患に対する効果に関して、経口投与の報告は数多く知られているが経口投与では急性疾患や慢性疾患の急性増悪期には効果は期待できない。今回我々が作成した脂肪酸乳剤は、急速に血中、組織内濃度を上昇させることが可能であり、そのような急性疾患に効果が期待できると考えられる。また、我々が作製したような脂肪酸乳剤は、炎症巣、動脈硬化巣に選択的に取り込まれること、また持続的にとどまることが以前より報告されている。従って目的とする病巣に、より選択的に、持続的に効果を示す可能性があり、非常に有用性の高い薬剤であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Nakamura N, Kumasaka R, Y-F Lu, Fujita T, Murakami R, Shimada M, Shimaya Y, Osawa H, Yamabe H, Okumura K, Hamazaki K, Hamazaki T: Effects of tridocosahexaenoyl-glycerol emulsion on proteinuria in rats with nephrotoxic serum nephritis. *Nephron Extra*, 2011, 1: 139-146. (査読あり)
DOI: 10.1159/000333479
2. Hamazaki-Fujita N, Hamazaki K, Tohno H, Itomura M, Terashima Y, Hamazaki T, Nakamura N, Yomoda S: Polyunsaturated fatty acids and blood circulation in the forebrain during a mental arithmetic task. *Brain Res*, 2011,

- 1397: 38-45. (査読あり)
3. Yamabe H, Nakamura N, Shimada M, Murakami R, Fujita T, Shimaya Y, Kitajima M, Urushizaka M: Clinicopathological study on hepatitis C virus-associated glomerulonephritis without hepatitis C virus in the blood. Intern Med, 2010, 49: 1321-1323. (査読あり)
 4. Shimoyama Y, Nakamura N, Kawaguchi T, Okumura K: Complications after surgery in hemodialysis patients: A comparison between diabetic and non-diabetic patients. Dialysis & Transplantation, 2009, 38: 412-414. (査読あり)
 5. Shimada M, Yamabe H, Osawa H, Nakamura N, Kumasaka R, Murakami R, Fujita T, Osanai T, Okumura K: Extracellular matrix metalloproteinase inducer is expressed in the proximal tubular epithelial cells of the human kidney. Nephrology, 2009, 14(2): 171-178. (査読あり)
 6. 中村典雄: CKD患者の輸液と経腸栄養の指針—ステージ4・5患者への対策. Ⅲ脂脂肪酸輸液の指針. 臨床透析, 2009, 25(13): 1795-1800. (査読なし)

[学会発表] (計3件)

1. Shimada M, Shimaya Y, Yamabe H, Fujita T, Murakami R, Nakamura N, Okumura K: Thrombin stimulates synthesis of GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MCP-1 and IL-8 in human proximal tubular epithelial cells in culture. World Congress of Nephrology 2011, 2011, 4, 8-12, Vancouver, Canada.
2. Yamabe H, Shimada M, Murakami R, Fujita T, Shimaya Y, Nakamura N, Okumura K: Mizoribine (MZR) suppresses proliferation of rat glomerular epithelial cells (GEC) in culture and attenuates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) augmented by thrombin. World Congress of Nephrology 2011, 2011, 4, 8-12, Vancouver, Canada.
3. Yamabe H, Nakamura N, Shimada M, Murakami R, Fujita T, Shimaya Y, Okumura K, Kaizuka M: Pathological findings by electron microscopy in hepatitis C virus-associated glomerulonephritis. The 12th Asian Pacific Congress of Nephrology, 2010, 6,

5-8, Seoul, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 典雄 (NAKAMURA NORIO)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60332657

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし