

## ラットにおけるシスプラチンとスルファジアジン銀の トランスポーターを介した相互作用の検討

小田 祐一郎, 日高 宗明, 鈴木 彰人

Investigation of transporter-mediated interaction between cisplatin and silver sulfadiazine in rats

Yuichiro Oda, Muneaki Hidaka and Akito Suzuki\*

### Abstract

Cisplatin (CDDP) is a platinum complex and is used for treatment of solid tumors. CDDP administered intravenously is ingested into the cells by copper transporter 1 (CTR1). Silver sulfadiazine (AgSD) is a topical antibiotic that prevent wound infection. Ag is reported to inhibit the mechanism of CTR1. We examined transporter-mediated drug-drug interaction using CDDP and AgSD in rats. The serum concentrations of platinum in blood and in kidney and liver tissues were measured. A blood test was performed to observe the interactive effects of CDDP and AgSD. AgSD pretreatment significantly decreased the concentrations of platinum in blood and in kidney tissue compared to the control. AgSD also diminished the CDDP-induced abnormalities of serum creatinine level but did not affect CTR1 expression. In contrast, no significant change was observed in platinum concentration in liver tissue after AgSD pretreatment. However, the level of alanine aminotransferase increased after administration of CDDP with or without AgSD. These results suggest that CDDP administered intravenously interacts with AgSD applied to region of wound, in association with changing the platinum concentrations in blood and tissue distribution. The interactive effects of CDDP may relate to modulate the function of platinum transferring via CTR1 in the presence of Ag.

**Key words :** Cisplatin, Copper transporter 1 (CTR1), Silver sulfadiazine

**キーワード :** シスプラチン, Copper transporter 1 (CTR1), スルファジアジン銀

### 緒 言

シスプラチン (CDDP) はPt誘導体に分類される抗悪性腫瘍薬の一つであり, 肺癌をはじめとして, 食道癌, 子宮頸癌, 胃癌等多くの癌種に対し使用されている. CDDPは細胞内に取り込まれた後DNAと架橋形成し, DNAの転写および複製を阻害することが知られている. その殺細胞作用は細胞内濃度に依存し, CDDPの取り込みや排泄といった細胞内動態はCDDPの作用発現に影響すると考えられている.

CDDPの細胞内取り込みには, Organic cation transporter 2 (OCT 2)<sup>1)</sup> およびCopper transporter 1 (CTR 1)<sup>2)</sup> が関与するが, いくつかの金属がトランスポーターを介したCDDPの細胞内取り込みに影響をおよぼすことが知られている. MgはOCT 2を介した細胞内CDDP取り込みを阻害し<sup>3)</sup>, 硫酸Mg補充はCDDP誘発性腎障害に対して予防的効果を示す<sup>4)</sup>との報告がある. また, AgはCTR 1の阻害因子であり<sup>5)</sup>, Agを含有した食餌を与えたマウスにCDDPを投与するとCDDPの血中濃度および臓器内取り込み量に変化することが報告されている<sup>6)</sup>.

Agは殺菌作用を持つため、臨床ではAg含有クリーム剤としてスルファジアジン銀 (AgSD) が皮膚潰瘍の二次感染に使用されている。また、CDDPを用いた癌治療において患者の皮膚病変に対してAgSDを使用する事例もある<sup>7)</sup>。AgSDは皮膚潰瘍部位に塗布すると、Agが血中に容易に移行することが知られており、AgSDの使用はCTR1に影響をおよぼし、細胞内へのCDDPの取り込み量を変化させてCDDPの効果および副作用発現に影響することが想定される。

本研究では、ラットにおいてAgSDがCDDPの体内動態および副作用発現におよぼす影響を明らかにするため、血中および臓器内CDDP濃度の変化、血清生化学検査について検討した。

## 材料および方法

### 1. 動物および試薬

ラットはSD系雄性6週齢 (日本エスエルシー) を使用した。ラット用固形飼料および水は自由摂取とした。飼育環境は日照サイクル12hr, 温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度 $60 \pm 6\%$ とした。ラットは使用開始まで7日以上飼育を行った。試薬および医薬品は、CDDP (Sigma-Aldrich), 生理食塩液 (大塚製薬), ゲーベン®クリーム1% (田辺三菱製薬) を用いた。CDDPは生理食塩液に溶解して用いた。ゲーベン®クリーム1%の比較の対照には白色ワセリン (健栄製薬) を用いた。薬剤処置およびサンプル採取時の麻酔処置は、ジエチルエーテル (和光純薬工業) を使用した。動物実験は、九州保健福祉大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

### 2. 投与

ラットにゲーベン®クリーム1% (AgSDとして60mg/kg) または白色ワセリン (6g/kg) を5日間連続皮下投与した。ゲーベン®クリーム1%の投与量および投与方法はインタビューフォームを参考にした。ゲーベン®クリーム1%のラットにおける薬物動態の検討および毒性評価には皮下投与方法が用いられており、本投与方法は皮膚潰瘍部位へ塗布した場合と同様に血中にAgが移行することが報告されている<sup>8)</sup>。AgSDまたは白色ワセリンを5日間連続投与 (前処置) した後、24hr経過した時点でCDDP (7.5mg/kg) 溶液または生理食塩液を尾静脈内に投与した。投与量は、ラットに対するCDDPのLD<sub>50</sub>値に基づいて算出した。

### 3. 採血および臓器摘出

実験プロトコルをTable 1に示す。AgSD連日投与

中は、24hr毎に心臓から採血 (約1 mL) した。AgSDを5日間投与した後、CDDPを投与した。CDDP投与後0, 0.5, 2, 24, 96hrに臓器の摘出を行った。臓器は肝臓および腎臓を対象とした。採血はCDDP投与後96hrに下大動脈より行った。

Protocol										
Day	0	1	2	3	4	5			6	9
Time (hr)						0	0.5	2	24	96
Treatment	AgSD	AgSD	AgSD	AgSD	AgSD	CDDP				
Ag concentration in blood (Atomic Absorption spectrometry)		○	○	○	○	○				
Pt concentration in blood and organs (Atomic Absorption spectrometry)							○	○	○	○
CTR1 expression (Western blotting)						○				
Biochemical test										○

Table 1. 投与スケジュールおよび実験手順  
60mg/kgのAgSDを5日間連続皮下投与した後、7.5mg/kg CDDPを尾静脈注射した。AgSDおよびCDDPの比較の対照として、それぞれ白色ワセリンおよび生理食塩液を投与した。

### 4. 血中Ag濃度測定

血液を遠心分離し (1500×g, 10min), 血清を得た。血清を0.1NHCl+0.01% Triton-Xで希釈し、原子吸光光度法を用いてAg濃度を測定した。

### 5. 血中および臓器内Pt濃度測定

血液を遠心分離し (1500×g, 10min), 血清を得た。肝臓および腎臓は摘出後、摘出した組織の一部に濃硝酸を加え24hr室温でインキュベーションし試料を完全に溶解した。血清および試料溶液をそれぞれ0.1NHCl+0.01% Triton-Xで希釈した。血清および臓器内Pt濃度は原子吸光光度法により測定した。

### 6. 血清生化学検査

血液を遠心分離 (1500×g, 10min) して得られた血清を用い、Serum creatinine (SCr) および Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) 濃度の測定を行った。SCr濃度はQuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (BioAssay systems) を使用し測定した。ASTおよびALT濃度はトランスアミナーゼCIIテストワコー (和光純薬工業) を使用し測定した。

### 7. CTR1発現量測定

肝臓および腎臓は摘出後、組織を小切片にし、Mammalian Protein Extraction Buffer (GEヘルスケア) を用いてホモジナイズした。その後、遠心分離 (4℃, 16000×g, 10min) して上清を得た。上清にSDSと2-メルカプトエタノールを加え、加熱処理し (100℃, 5min)

サンプルとした。CTR1発現量はWestern blot法により測定した。抗体は, Anti CTR1 Rabbit-poly antibody (Novus Biologicals) およびAnti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell signaling technology) を使用した。

8. 統計学的処理

データは平均値±標準偏差で示した。2群間の比較には, *t*-testを用いた。また, 3群間以上の比較にはTukey-kramer法を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

1. 血中Ag濃度

AgSDを5日間連続皮下投与したときの血中Ag濃度の経時変化をFigure 1に示す。血中Ag濃度はday 1で $6.71 \pm 4.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり, day 5では $18.62 \pm 4.55 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。AgSDの連日投与により血中Ag濃度は上昇した。

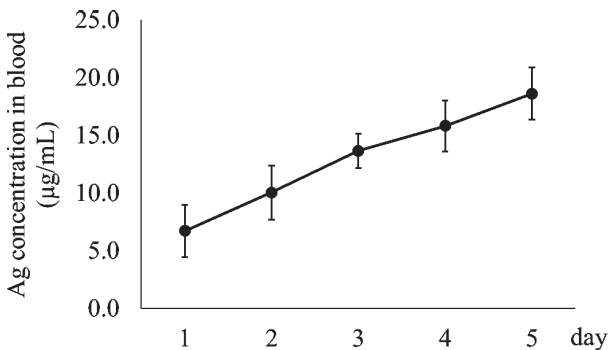


Figure 1. AgSD投与による血中Ag濃度の経時変化  
ラットにAgSDを5日間連続皮下投与した際の血中Ag濃度の経時変化を測定した。測定には原子吸光度法を用いた。数値は平均値±標準偏差で示している (n=5)。

2. 血中および臓器内Pt濃度

AgSDの前処置がCDDPの体内動態におよぼす影響を検討するため, 血中および臓器内Pt濃度を測定した。血中Pt濃度の経時変化をTable 2に示す。AgSDの前処

Group	Time (hr)			
	0.5	2	24	96
CDDP	7.56±0.80	3.23±0.33	1.77±0.16	0.77±0.13
AgSD+CDDP	7.16±1.10	2.57±0.09*	1.36±0.13*	0.57±0.10*

Table 2. AgSD投与が血中Pt濃度におよぼす影響  
ラットにCDDPを単独投与またはAgSDと併用投与した。併用投与では, AgSDを5日間皮下投与した後, CDDPを投与した。CDDP群(コントロール)には白色ワセリンを投与後, CDDPを投与した。濃度の測定は原子吸光度法を用いた。表中の数値(平均値±標準偏差)はPtの血中濃度(µg/mL)を示している (n=6)。

置はCDDP投与後2 hr以降の血中Pt濃度を有意に低下させた。臓器内Pt濃度をFigure 2に示す。AgSDの前処置は, CDDP投与直後の腎臓内Pt濃度を有意に低下させたが, 肝臓内Pt濃度には影響を及ぼさなかった。

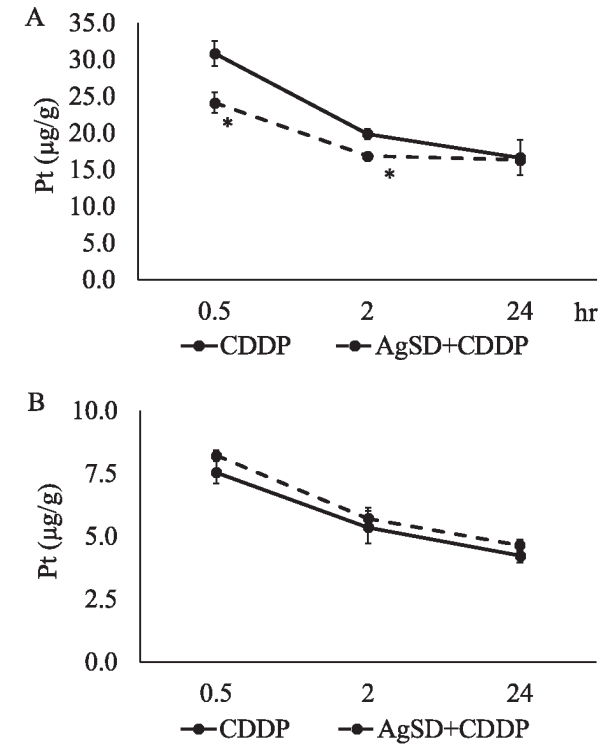


Figure 2. AgSD投与が臓器内CDDP濃度におよぼす影響  
ラットにCDDPを単独投与またはAgSDと併用投与した。併用投与では, AgSDを5日間皮下投与した後, CDDPを投与した。CDDP群(コントロール)には白色ワセリンを5日間投与後, CDDPを投与した。(A) 腎臓および(B) 肝臓を摘出し, 臓器組織中のPt濃度を原子吸光度法により測定した。数値は平均値±標準偏差で示している (n=3)。

4. 血清生化学検査

CDDP単独投与およびAgSDとCDDP併用投与が腎機能および肝機能におよぼす影響を検討した。腎機能の指標としてSCrを, 肝機能の指標としてASTおよびALTを測定した。SCr, AST, ALTの測定結果をFigure 3に示す。SCrはCDDP投与により有意に上昇した。また, AgSDとCDDPの併用でも, SCrは有意に上昇したが, CDDP単独投与時と比較して上昇の程度は小さかった。ASTはAgSDとCDDPの併用投与群で上昇した。ALTはCDDP投与およびAgSD併用投与のいずれでも同程度の上昇が見られた。

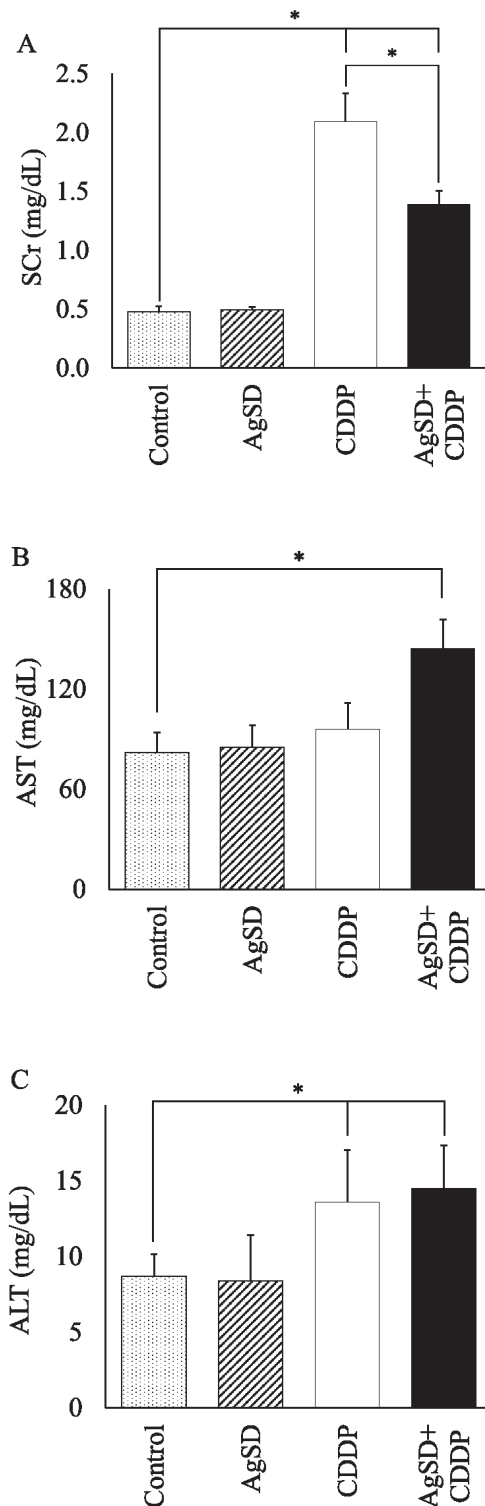


Figure 3. AgSDおよびCDDP投与が腎機能および肝機能に及ぼす影響

ラットにAgSD単独, CDDP単独, またはAgSD+CDDP併用投与した。併用投与では, AgSDを5日間皮下投与した後, CDDPを投与した。Control群には白色ワセリンを用いた。採血した後, 血清生化学検査を行った。腎機能の指標として (A) SCrを, 肝機能の指標として (B) AST, (C) ALTをそれぞれ測定した。数値は平均値±標準偏差で示している (n=6)。

### 3. CTR1発現量

AgSD投与が腎臓および肝臓のCTR1発現量におよぼす影響を検討した。AgSD連日投与後のCTR1発現量をFigure 4に示す。腎臓および肝臓のいずれにおいてもAgSD投与はCTR1発現量を変化させなかった。

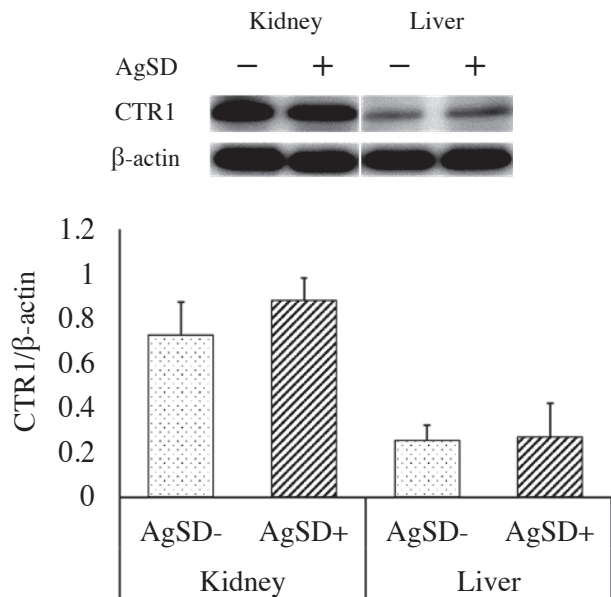


Figure 4. AgSD投与後の腎臓および肝臓におけるCTR1発現量変化

ラットにAgSDを5日間連続投与した。AgSD-群(コントロール)には白色ワセリンを投与した。腎臓および肝臓を摘出し, 臓器組織中のCTR1発現量をWestern blot法により測定した。数値は平均値±標準偏差で示している (n=3)。

## 考 察

CDDPはトランスポーターにより細胞内外へ輸送されることが知られている。また, Mg, Ag, Cuなどの金属はCDDPの細胞内取り込みに影響をおよぼすことが報告されている。本研究では, ラットにおいてAg含有医薬品であるAgSDとCDDPの相互作用を検討した。

ラットへのAgSDの連日投与により, Agの血中での蓄積がみられた。また, AgSDの5日間投与後の血中Ag濃度は $18.62 \pm 4.55 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Figure 1)。Leeらは, マウスにAgを含有した食餌を与え, 血中Ag濃度が約 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇し, CDDPの体内動態を変化させたことを報告している<sup>6)</sup>。このことから, 本研究で用いた皮下投与はラットでのAgSDとCDDPの相互作用を検討するにあたり, 適切な投与方法であると判断した。

CDDPは副作用として腎障害および肝障害を起こすことから, これらはCDDPの投与規制因子となっている。AgSDの5日間投与(前処置)がCDDPの副作用発現に

およぼす影響を検討するため、腎機能の指標としてSCrを、肝機能の指標としてALTおよびASTを測定した。

AgSDの投与は、腎臓内Pt濃度を低下させ (Figure 2 A), CDDPによるSCrの上昇を減弱した (Figure 3 A)。AgはCTR 1 を介したCDDPの細胞内取り込みを阻害することが報告されているが<sup>5)</sup>, そのメカニズムは明らかでない。Holzerらは、CTR 1 へのCuの暴露によりCTR 1 の発現量が低下し、CDDPの取り込み量に減少がみられることを報告している<sup>9)</sup>。本研究においてラットへのAgSD投与は腎臓でのCTR 1 発現量に変化を起こさなかった (Figure 4)。これらのことから、AgSDの皮下投与は腎臓においてCTR 1 でのCDDP取り込み機能を抑制し、CDDPによる腎組織への負荷を軽減したと考えられる。

AgSDは肝臓でのCTR 1 発現量を変化させなかった (Figure 4)。また、肝臓内Pt濃度およびCDDPによるALTの上昇にも影響をおよぼさなかった (Figure 2 B, 3 C)。一方、ASTに関してはAgSDとCDDPの併用により上昇がみられた (Figure 3 B)。ASTはALTと比較し肝障害マーカーとして特異性が低く、赤血球、心筋、骨格筋等にも分布している。ASTに変化がみられたことからAgSDはCDDPと何らかの相互作用を起こした可能性が考えられるが、その原因として肝組織以外の関与の可能性も否定できない。

AgSDはPtの腎組織内での挙動および血中Pt濃度に変化をもたらすと同時に腎機能にも影響をおよぼすことが明らかとなった。潰瘍部位へのAgSDの塗布はCDDPと相互作用を起こすことが示唆された。

## 謝 辞

本研究に協力を頂いた本学薬学部臨床薬学第三講座の土肥聡子氏、大橋あゆみ氏に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Filipiński KK., Mathijssen RH., Mikkelsen TS., et al.: Contribution of organic cation transporter 2 (OCT-2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 86: 396-402, 2009.
- 2) Ishida S., Lee J., Thiele D., et al.: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 14298-14302, 2002.
- 3) Lajer H., Kristensen M., Hansen HH., et al.: Magnesium depletion enhances cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 56: 535-542, 2005.
- 4) Hirai S., Kaida S., Ito T., et al.: Magnesium premedication prevents Cisplatin-induced nephrotoxicity in patients with esophageal and hypopharyngeal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 40: 743-747, 2013.
- 5) Lee J., Peña MM., Nose Y., et al.: Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem.* 277: 4380-7, 2002.
- 6) Zatulovskiy EA., Skvortsov AN., Rusconi P., et al.: Serum depletion of holo-ceruloplasmin induced by silver ions in vivo reduces uptake of cisplatin. *J Inorg Biochem.* 116: 88-96, 2012.
- 7) Meeuse JJ., Reyners AK., Wymenga AN.: Topical lidocaine in silver sulfadiazine cream on painful, cancer, or treatment-related skin lesions. *J Pain Symptom Manage.* 34: 223-225, 2007.
- 8) 上野 柁, 加藤 努, 諸橋 鉄男, 他: Silver Sulfadiazine の安全性に関する検討 (第 1 報) – Silver Sulfadiazine の急性毒性試験 –. *基礎と臨床.* 14: 2850 -2855, 1980.
- 9) Holzer AK1, Katano K, Klomp LW, et al.: Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 10: 6744-6749, 2004.