

シスプラチンを含むがん化学療法時の血中白金濃度推移と
腎機能マーカーの変動に関する研究

2013年

久米 学

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。

1. Manabu Kume, Hiroyuki Yasui, Yutaka Yoshikawa, Masanori Horinouchi, Kanae Higashiguchi, Yoko Kobayashi, Daisuke Kuroda, Takeshi Hirano, Midori Hirai and Tsutomu Nakamura : Transient elevation of serum cystatin C concentrations during perioperative cisplatin-based chemotherapy in esophageal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, **69** : 1537–1544 (2012). (第1章)
2. Manabu Kume, Hiroyuki Yasui, Minoru Takahashi, Chika Yamawaki, Kanae Higashiguchi, Yoko Kobayashi, Daisuke Kuroda, Takeshi Hirano, Midori Hirai and Tsutomu Nakamura : Perioperative change in plasma platinum concentration in patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *TDM 研究*, **30** : 142–148 (2013). (第2章)
3. Chika Yamawaki, Minoru Takahashi, Kohji Takara, Manabu Kume, Midori Hirai, Hiroyuki Yasui and Tsutomu Nakamura : Effect of dexamethasone on extracellular secretion of cystatin C in cancer cell lines. *Biomed Rep*, **1**: 115-118 (2013). (第3章)

目次

序論.....	1
第1章 5-FU/CDDP 療法施行時の白金、クレアチニン及びシスタチン C の血中濃度推移.....	3
第1節 諸言.....	3
第2節 方法.....	4
1. 対象と治療.....	4
2. 血液サンプル.....	4
3. 血清シスタチン C 濃度の測定.....	5
4. 血漿中白金濃度の測定.....	5
5. データ分析.....	5
6. 統計解析.....	5
第3節 結果.....	7
第4節 考察.....	13
第5節 小括.....	16
第2章 血中白金濃度に及ぼす手術の影響.....	17
第1節 諸言.....	17
第2節 方法.....	18
1. 対象と治療.....	18
2. 血液サンプル.....	18
3. 血漿中白金濃度と血清シスタチン C 濃度の測定.....	18
4. データ解析.....	18
5. 統計解析.....	19
第3節 結果.....	20

第4節 考察.....	26
第5節 小括.....	28
第3章 培養癌細胞におけるシスタチンC分泌に及ぼすデキサメタゾンの影響.....	29
第1節 諸言.....	29
第2節 方法.....	30
1. Materials.....	30
2. 細胞培養.....	30
3. Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) 法によるシスタチンC濃度の測定.....	30
4. WST-1 colorimetric assay.....	31
5. 統計解析.....	31
第3節 結果.....	32
1. シスタチンC分泌量に対するデキサメタゾンの影響.....	32
2. Cell viability analysis.....	34
第4節 考察.....	35
第5節 小括.....	37
総括.....	38
謝辞.....	42
引用文献.....	43

略語表

5-FU	5-fluorouracil : フルオロウラシル
5-HT3	5-hydroxytryptamine : ヒドロキシトリプタミン
Alb	albumin : アルブミン
CDDP	cisplatin : シスプラチン
Cr	creatinine : クレアチニン
CysC	cystatin C : シスタチン C
CRP	C-reactive protein : C 反応性蛋白
DEX	dexamethasone : デキサメタゾン
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid : エチレンジアミン四酢酸
FP	5-fluorouracil / cisplatin : フルオロウラシル/シスプラチン
GFR	glomerular filtration rate : 糸球体濾過量
POD	postoperative day : 手術後の日数
Pt	platinum : 白金

序論

2011年の我が国の主な死因別の死亡率（人口10万対）は、がん283.2、心臓病154.5、肺炎98.9、脳卒中98.2、不慮の事故47.1などとなっている。年次推移においても、がんは一貫して上昇を続けており、昭和56年以降死因順位の第1位であり、2011年の我が国のがん死亡者数は35万人を超えている。がんの部位別死亡率は、男性では肺癌、胃癌、大腸癌の順に、女性では大腸癌、肺癌、胃癌の順に高くなっている¹。

シスプラチン(CDDP)は、固形癌に対して世界中で幅広く使用されている抗癌剤の1つである。しかし、投与後に発現する末梢神経障害や腎障害などの用量制限毒性が問題となり、治療完遂に至らないケースも認められる^{2,4}。このため、CDDPの投与に際しては、これら副作用の予防ならびに早期発見が極めて重要である。CDDPは主に腎臓から体外へ排泄される。血漿中の遊離体CDDPは投与後速やかに消失し、半減期は約30分である。血漿中の総CDDPは相対的に半減期が長く、投与後も血漿中あるいは組織中に長期間滞留することが報告されている^{5,8}。その要因の1つとして、CDDPとアルブミン(Alb)のような血中タンパク質との結合が挙げられる。一方、CDDPを含む投与後数カ月から数年間経過後も血中から白金(Pt)が検出され、血中に残存するPtの10%程度は活性体として存在することが報告されている⁷。転移性胚細胞腫患者において、CDDP化学療法終了時では感覚異常を有する患者の割合は11%であったのに対し、終了3カ月後にはその割合は65%に上昇していた⁹。更に、Sprautenらは血清中に残存するPt濃度とCDDPによる末梢神経障害や聴覚毒性の重篤度との関連を報告しており¹⁰、化学療法後に血清中に残存するPt濃度が末梢神経障害のような遅発性副作用のマーカーになる可能性が示唆される。一方、CDDPによる腎障害は、近位尿細管を傷害することにより発現することが知られており、CDDPを含むがん化学療法中のGFR低下を検出するマーカーとして、シスタチンC(CysC)はクレアチニン(Cr)よりも優れていると報告されている¹¹。

CysCは、全身の有核細胞で産生される分子量約13 kDaのタンパク質であり、腎糸球体濾過によって体内から消失すること、その体内産生量が年齢、性別、筋肉量や運動などの影響を受けにくいことの原因から、Crに代わる糸球体濾過速度マーカーとして期待されている。一方で、CysC

は薬剤や炎症状態等の病態により影響を受けることから、その変動要因を検討する必要があると考えられる。

本研究では、CDDP の適正使用を目的として、食道癌に対する標準的治療法である 5-FU/CDDP 療法 (FP 療法) ^{12,13} を取り上げ、FP 療法施行時の血中 Pt 濃度推移と腎機能マーカーとの相関性ならびにそれらの変動要因について検討を行った。具体的には、第 1 章では FP 療法施行時の Pt、Cr 及び CysC の血中濃度推移、第 2 章では血中 Pt 濃度に及ぼす手術の影響、第 3 章では培養癌細胞における CysC 分泌に及ぼすデキサメタゾン (DEX) の影響について検討を行った。以下、これらの結果を論述する。

第1章 5-FU/CDDP 療法施行時の白金、クレアチニン及びシスタチンC の血中濃度推移

第1節 諸言

CDDP は、世界中で幅広く用いられている抗癌剤の1つであり、固形癌に対する有効性が示されている。一方で、糸球体濾過量 (GFR) の低下を伴う腎機能障害が用量制限毒性として規定されている^{2,3}。従って、CDDP を含むがん化学療法を施行する際は、腎機能のモニタリングが極めて重要となる。

CysC は分子量 13.3kDa の血清タンパク質の1種であり、シスタチンスーパーファミリーの2型に属するアミノ酸 120 残基のポリペプチドである。生体内ではシステインプロテアーゼインヒビターとして機能しており、全身の有核細胞で産生され、一定速度で血中へ分泌された後、腎糸球体で濾過される¹⁴⁻¹⁶。また近位尿細管で完全に再吸収されるといった特徴を有する³⁻⁵。これらのことから、CysC は Cr と同様に GFR の内因性マーカーとして有用であると考えられている。実際に、CysC は、バンコマイシンやカルボプラチンといった腎排泄型薬剤の薬物動態の推定に活用されている^{17,18}。CDDP も主に腎臓から排泄され⁵、腎障害発現時は Pt 半減期の延長と血清 CysC 濃度の上昇が認められる。成人と小児において、CDDP を含む化学療法施行後は CysC の上昇が認められ^{19,20}、CDDP を含むがん化学療法中の GFR 低下を検出するマーカーとして、CysC は Cr よりも優れていると報告されている¹¹。しかしながら、血中 Pt 濃度と CysC との関連性については不明な点が多く、CDDP 投与後の CysC 濃度の変動要因に関してはほとんど報告されていない。

本章では、食道癌術前化学療法あるいは術後補助化学療法として FP 療法を施行した食道癌患者6例を対象として、血漿中 Pt 濃度推移と血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度との相関性に基づき、血清 CysC 濃度の変動要因について検討した。

第2節 方法

1. 対象と治療

本研究計画は、神戸大学医学部等医学倫理委員会の承認を得て実施した。本研究は、術前がん化学療法あるいは術後補助化学療法として、FP療法を施行した食道癌患者6名を対象に実施した。全ての被験者から事前に文書による同意を取得した。

FP療法は、CDDPの2時間の点滴投与（ $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ 、1日目）と5-FUの5日間持続点滴投与（ $800\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ 、1～5日目）とし、全被験者において計2サイクルを施行した。第1サイクルの期間は第2サイクルを開始するまで、第2サイクルの期間は手術日または2nd lineの化学療法（tri-weekly docetaxel regimen）へ変更するまでの期間とした。結果、第1サイクル及び第2サイクルの期間は、それぞれ28-42日及び21-64日であった（Fig. 1-1）。第1サイクルで発現した有害事象により、第2サイクルでは、2例（#1、#5）で投与量を減量した。全ての被験者について、CDDPによる副作用発現を防止するために、水分負荷及び制吐剤（グラニセトロン（1 mg on day 1）、DEX（6.6 mg on day 1 and 3.3 mg on days 2 and 3）、アプレピタント（125 mg on day 1 and 80 mg on days 2 and 3））の前投薬を行った。なお、#1は、グラニセトロンの代わりにパロノセトロンを投与した。

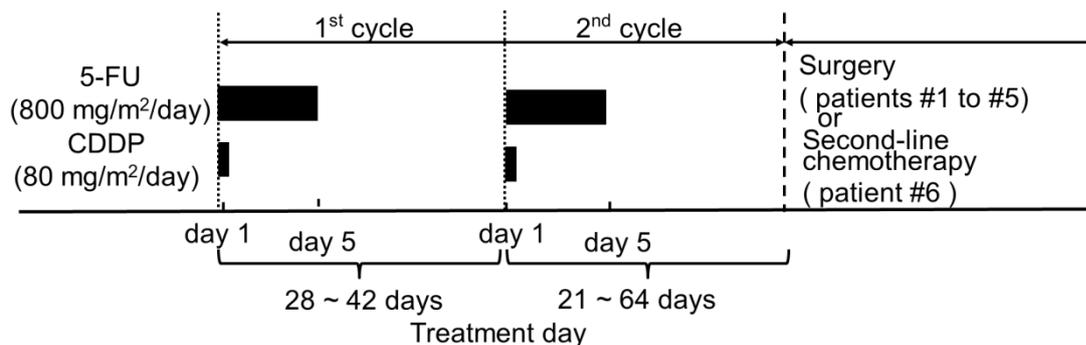


Fig.1-1 Treatment schedule of CDDP-based chemotherapy.

5-FU 5-Fuorouracil, CDDP cisplatin

2. 血液サンプル

エチレンジアミン四酢酸（EDTA）処理あるいは非処理の採血管を用いて各被験者の末梢静脈血（5 mL）を採取した。血液は 11-16 ポイントで採取した。採血ポイントは、CDDP 投与前、投与

後2日、4日及び7日後とした。#6では、4日、7日後の採血が6日、8日後となった。血漿は、EDTA処理した採血管を用いて採血し遠心操作（5分間、3000回転）により分離した。血清はEDTA非処理の採血管を用いて採血し遠心操作により分離した。血漿及び血清は測定まで-40℃で保管した。

3. 血清 CysC 濃度の測定

血清 CysC 濃度は、Dimension Vista 500 analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA)を用いて、ラテックス免疫比濁法により測定した。

4. 血漿中 Pt 濃度の測定

血漿中Pt濃度は、先に報告されている方法で測定した²¹。200℃に過熱した環境で、硝酸、過酸化水素及び過塩素酸を用いて繰り返し処理し、各サンプル（0.1 mL）を灰化した。灰化したサンプルを7% 硝酸5 mLに溶解し、Shimadzu ICPM-8500（Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて、誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）法により測定した。チューブやその他からの汚染を避けて、Pt含有量を1サンプルあたり3回測定した。各サンプルのPt濃度は、Pt標準液を用いて作成した検量線から線形回帰により計算した。検量線は、1-500 ng /mLの範囲で作成した（ $r = 0.999$ ）。

5. データ分析

各被験者の血漿中Pt濃度推移は、1-コンパートメントモデルにより解析し、薬物動態パラメータを算出した。各サイクル、1患者あたり合計5-9の測定値に対し非線形最小二乗法（MULTI）²²を用いて解析した。各Pt濃度の逆数で重みづけして、第1サイクルと第2サイクルの消失速度定数（ K_{el} ）及び半減期（ $t_{1/2}$ ）を含む薬物動態パラメータを算出した。

6. 統計解析

データは平均値±標準偏差（SD）で示した。各被験者の血清CysC濃度について、各サイクルにおける化学療法開始前後の差は、nonparametric Friedman testとSteel–Dwass multiple comparison testを用いて検定した。第1サイクルと第2サイクルにおけるPtの薬物動態パラメータは、paired t

testを用いて検定した。Pearson correlation testを用いて、血漿中Pt濃度と血清Cr、血清CysC濃度ならびに血清Alb濃度との相関性を検討した。有意水準は両側5%とした。

第3節 結果

患者背景をTable 1-1に示した。男性5例、女性1例の計6例で年齢は 63.7 ± 10.4 歳であった。全ての被験者において、今回のFP療法が初回化学療法であった。

Table 1-1 Clinical characteristics of patients.

Patient	Age (years)	Gender	Surgical history
#1	50	Female	No
#2	55	Male	No
#3	72	Male	No
#4	70	Male	No
#5	76	Male	No
#6	59	Male	Yes
Mean	63.7	-	-
S.D.	10.4	-	-

FP療法開始前の臨床検査値、CDDPの投与量及び薬物動態パラメータをTable 1-2に示した。FP療法開始前の血清CysC濃度について、第1サイクルと第2サイクルとの間で有意な差が認められた。全被験者におけるFP療法開始前の血清CysCと血清Cr濃度は、それぞれ 0.77 ± 0.12 mg/L及び 0.84 ± 0.19 mg/dLであった。

Table 1-2 Baseline laboratory tests, dose of CDDP and plasma pharmacokinetic parameters of Pt.

Patient	Baseline serum CysC concentration ^a (mg/L)		Baseline serum Cr concentration ^a (mg/dL)		Baseline serum Alb concentration ^a (g/dL)		Cycle duration (days)		CDDP dose (mg)		C_{2d}/dose^b (ng/mL/mg CDDP)		K_{el} (/day)		$t_{1/2}$ (h)	
	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle	1 st cycle	2 nd cycle
	#1	0.64	1.22	0.51	0.87	3.2	4.0	35	31	116	100 ^c	7.3	9.4	0.0475	0.0475	350.6
#2	0.79	0.86	0.95	1.02	3.7	3.3	28	36	138	136	7.7	9.9	0.0489	0.0519	340.0	320.8
#3	0.95	1.40	0.99	1.45	3.8	3.9	35	51	161	160	5.6	9.4	0.0470	0.0444	353.6	374.5
#4	0.64	0.79	1.00	0.98	3.7	4.1	28	21	140	137	7.1	4.9	0.0530	0.0259	313.7	643.2
#5	0.80	0.98	0.86	1.01	2.9	2.8	34	29	114	90 ^c	8.6	8.9	0.0777	0.0663	214.0	250.8
#6	0.81	0.88	0.70	0.69	3.0	2.7	42	64	114	112	8.9	13.6	0.0464	0.0376	358.2	442.4
Mean	0.77	1.02	0.84	1.00	3.4	3.5	33.7	38.7	130.5	122.5	7.5	9.4	0.0534	0.0456	321.7	397.0
S.D.	0.12	0.24	0.19	0.25	0.4	0.6	5.2	15.9	19.1	26.3	1.2	2.8	0.0121	0.0136	55.1	136.1
P value ^d	0.035 ^e		0.094		0.671		0.361		0.098		0.134		0.139		0.213	

^a) The baseline data was obtained on the first day of CDDP administration for each cycle.

^b) The value was obtained by subtracting the baseline level from C_{2d} adjusted by CDDP dose.

^c) Dose reductions in the second cycle were made in 2 patients (patients #1 and #5).

^d) The paired t-test was used to compare mean values in the first and second cycles.

^e) $P < 0.05$ compared with the value in the first cycle.

FP療法の第1サイクルと第2サイクルにおける血清Cr濃度と血清CysC濃度の推移をFig.1-2に示した。

全被験者の血清Cr濃度の平均値について、第1サイクルは 0.95 ± 0.15 mg/dL、第2サイクルは 1.15 ± 0.25 mg/dLであった。血清Cr濃度は、開始前と比較して第1サイクルでは98%から275%の変動が認められ、これら変動は第2サイクル（90%から161%）よりも大きなものであった。

血清CysC濃度は、開始前と比較して、第1サイクルでは87~236%、第2サイクルでは59~183%の変動が認められた。第1サイクル開始後1週間以内に血清CysC濃度の上昇が認められた。開始前と比較して、123%（#1）~143%（#6）の上昇であり、第1サイクルにおいて顕著であった。これら血清CysC濃度をHoek式²³を用いてeGFRに換算すると、それぞれ121.0から97.9 mL/min/1.73 m²及び94.8から64.9 mL/min/1.73 m²の変動に相当した。全被験者において、血清CysC濃度は10日ほどで開始前の値へ回復した。この変動は第2サイクルでも同様に観察された。第1サイクルにおいて、開始前と開始後2-7日の間で有意差が認められた（ただし、#6は採血時期が異なるため解析から除外し、N=5で検定）。第2サイクルでは、開始前と開始後2-4日では有意差が認められたが、開始前と開始後7日では有意差は認められなかった。一方、血清Cr濃度では、第1サイクルにおいて、開始前と開始後2日、4日では有意差は認められず、7日以降では有意な上昇が認められた。

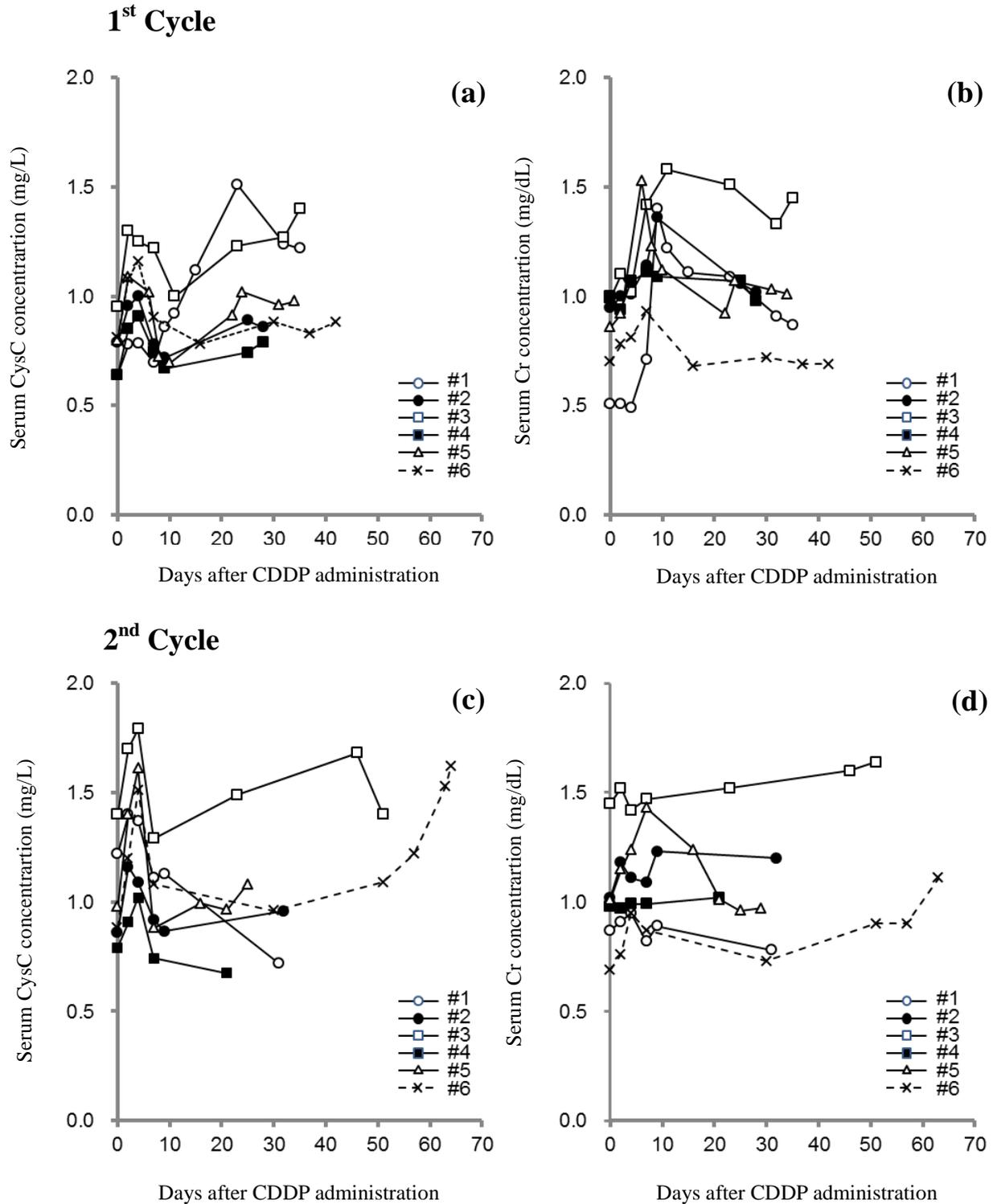


Fig.1-2 Time–concentration profiles of CysC and Cr in serum during the first (a, b) and second (c, d) cycles of the CDDP-based chemotherapy in 6 patients with esophageal cancer. The patients received neoadjuvant (solid line) or adjuvant (dotted line) chemotherapy.

Fig. 1-3に全被験者の血漿中Pt濃度の推移を示した。FP療法開始2日後のPt濃度 (C_{2d}) は、第1及び第2サイクルでそれぞれ 965 ± 82 ng/mL 及び $1,335 \pm 394$ ng/mLであった (Table 1-2)。 C_{2d} の値をその時のCDDP投与量で除した値 (C_{2d}/dose) は、統計学的な有意差は認められなかったが、第1サイクルと比較して第2サイクルの方が高値であった (第1サイクル: 7.5 ± 1.2 ng/mL/mg CDDP、第2サイクル: 9.4 ± 2.8 ng/mL/mg CDDP)。しかしながら、これらの値は、FP療法開始2日後の血清Cr濃度及び血清CysC濃度と関連しなかった。第1及び第2サイクルにおいて、 C_{2d}/dose 値と血清Alb濃度と間に負の相関が認められた (それぞれ、 $r = -0.802$ 及び -0.676)。また、第1サイクルの C_{2d}/dose 値と期間の間に正の相関が認められた ($r = 0.792$) (Fig. 1-4)。いずれも統計学的な有意差は認められなかった ($P = 0.055, 0.141$ 及び 0.060)。開始2日後以降、4例において第2、第3ピークが観察されたが血漿中Pt濃度は速やかに低下した。全被験者の薬物動態パラメータをTable 1-2に示す。第1サイクルにおける K_{el} と $t_{1/2}$ は、それぞれ 0.0534 ± 0.0121 /日及び 322 ± 55 hであり、第2サイクルの値 (0.0456 ± 0.0136 /日 及び 397 ± 136 h)と比較して大きな相違は認められなかった。

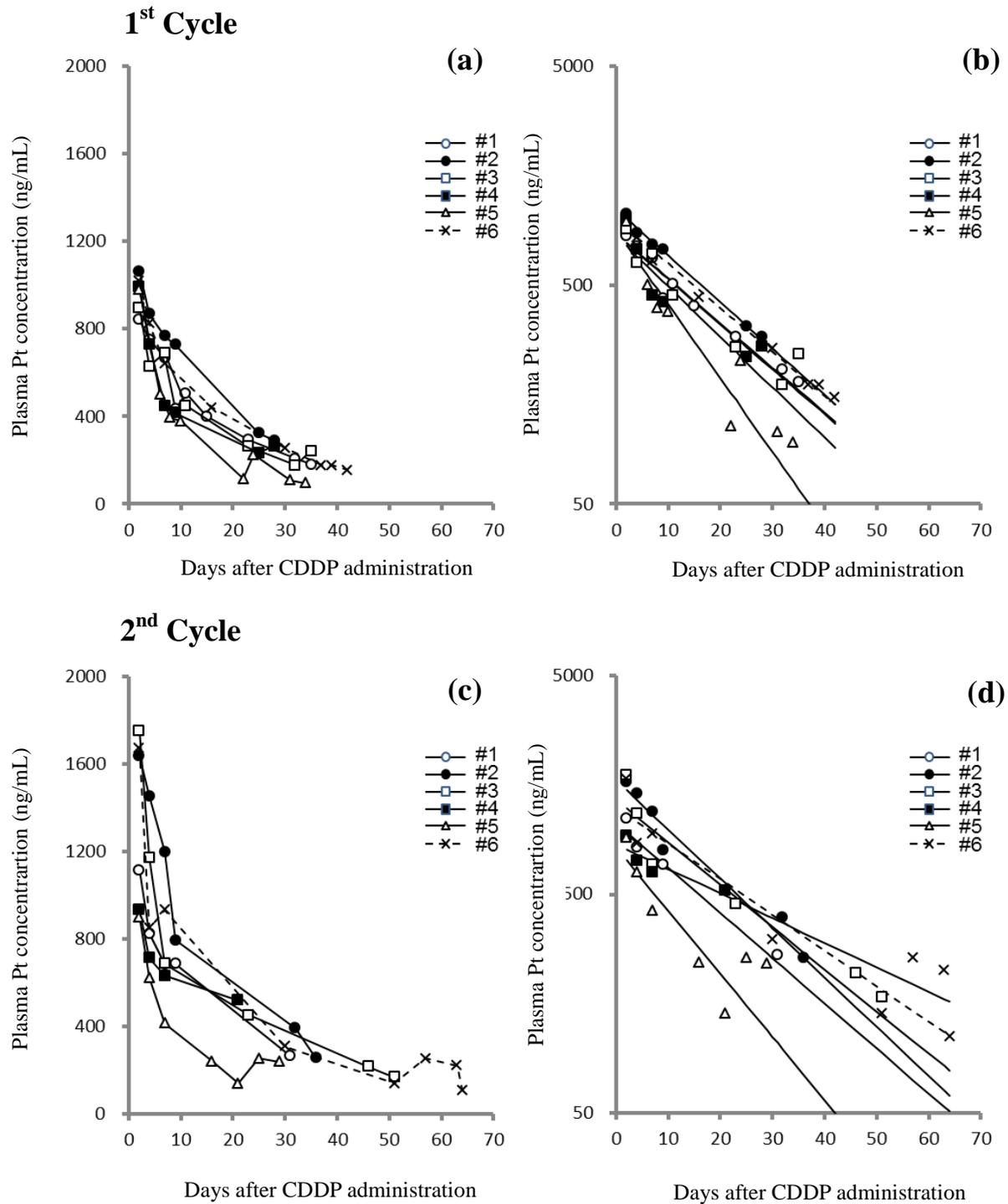


Fig. 1-3 Time-plasma Pt concentration profiles during the first (a, b) and second (c, d) cycles of CDDP-based chemotherapy in 6 patients with esophageal cancer. The patients received neoadjuvant (solid line) or adjuvant (dotted line) chemotherapy. Left (a, c) and right (b, d) panels indicate the observed and simulated pharmacokinetic profiles, respectively (see text for more details).

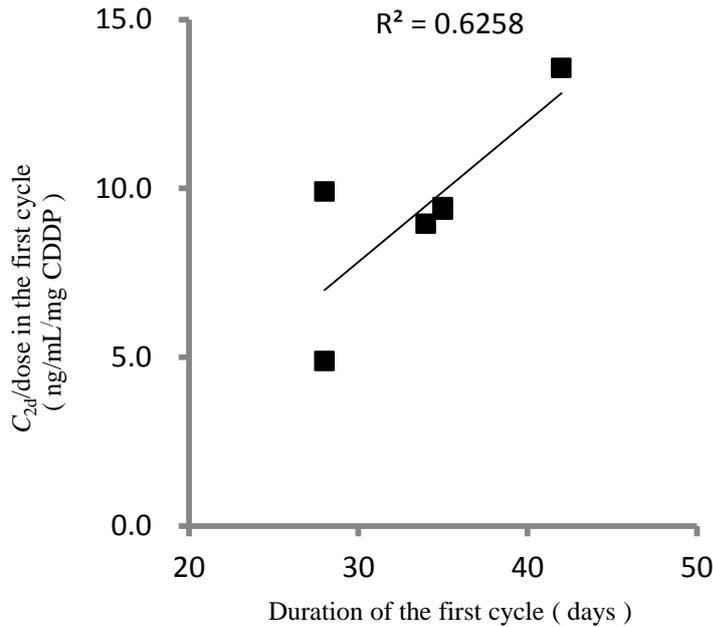


Fig. 1-4 Correlation between the C_{2d}/dose value and the duration of the first cycle.

第4節 考察

血清 Cr は腎機能を評価するマーカーとして幅広く用いられているが、近年、軽～中等度の腎機能障害に対する鋭敏なマーカーとして、CysC が注目されている。CysC は、年齢、性別、人種や筋肉量に依存しないことから、Cr よりも優れたマーカーであると考えられている¹⁴⁻¹⁶。本研究では、FP 療法を施行した全被験者において、CDDP 投与 10 日以内に血清 CysC 濃度の一過性の上昇が観察された (Fig. 1-2)。Keevil らは、健常人における血清 CysC と血清 Cr の個体内変動は、それぞれ 13.3 % 及び 4.9% であると報告しているが²⁴、本研究における血清 CysC 濃度の一過性の変動を個体内変動の範囲として説明することは困難である。血清 CysC 濃度の一過性の上昇の要因の 1 つとして、CDDP は腎機能障害を引き起こすため、CDDP 投与後に急性腎障害が発現した可能性が考えられる。血清 Cr 濃度では、CDDP 投与後 10 日以内に血清 CysC 濃度のような一過性の上昇は認められなかったことから (Fig. 1-2)、血清 CysC 濃度の変化から CDDP による早期の腎機能低下を評価できることが示唆された。また、血清 Cr 濃度では各サイクル開始時の値に有意差は認められなかったが、血清 CysC 濃度では第 1 サイクル開始時と比較して第 2 サイクル開始時では有意に高値を示したことから、血清 CysC 濃度は血清 Cr 濃度では検出できない早期の腎機能低下を評価できることが示唆された。

一方、CDDP 投与 2 日後の血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度と $C_{2d}/dose$ 値との間に相関が認められなかったことから、CDDP 投与初期においては血清 CysC 濃度は腎機能以外の要因でも変動した可能性を否定できない。このことは、血清 CysC 濃度を用いて GFR を推定した場合、血清 Cr と比べて 19%あるいはそれ以上に腎機能を低く見積もる可能性があることを示唆するものであった。血清 CysC 濃度に影響を及ぼす腎機能以外の要因としては、薬剤による影響が考えられる、一般に、CDDP を含む化学療法を施行する際は、5-HT₃ セロトニン受容体拮抗薬、DEX、アプレピタントといった制吐剤が前投薬される²⁵。HeLa 細胞に DEX を添加 ($>10^{-7}$ mol/L) することで、72 時間後の培養液中への CysC の発現と分泌量が増加すると報告されている²⁶。これまでの臨床研究の結果から、CDDP 投与 1 日後の DEX 濃度は 10^{-7} mol/L 以上であると考えられる^{27,28}。この濃度を維持するために必要となる DEX の投与量は不明であるが、本研究において観察された血清 CysC 濃度の一過性の上昇と DEX 投与時期とが一致している可能性が示唆された。また、血清 CysC 濃度に影響を与える制吐剤や抗癌剤に関する報告はほとんど存在しないものの、CysC と抗癌剤との関連について、Fehrenbacher と共同研究者らは CDDP ($50 \mu\text{mol/L}$) を添加した NIH3T3 誘導細胞において、cytosolic cysteine cathepsin 活性は増加したが²⁹、Seo らは CDDP ($100 \mu\text{mol/L}$) を添加した MCF7 細胞ではカテプシン S の mRNA 発現は誘導されなかったと報告している³⁰。FP 療法を施行した食道癌患者における血漿中 5-FU 濃度は $0.5 - 1.5 \mu\text{mol/L}$ であると報告されているが³¹、 $10 \mu\text{mol/L}$ 5-FU の暴露により、72 時間以内にヒト大腸癌細胞株でカテプシン B の開裂が生じると報告されている³²。CysC はカテプシンの内因性阻害因子であるため、CDDP や 5-FU により引き起こされたカテプシンのリソソームからの漏出によって、CysC の細胞内濃度及び細胞外分泌が増加する可能性が考えられる^{33,34}。CysC の発現機序については、未だ不明な点が多く更なる検討が必要であるが、本研究における血清 CysC 濃度の変動は DEX と CDDP/5-FU との相乗効果によって増強された可能性も否定できない。

CDDP は主に腎臓を経て体内から消失することから、腎障害が発現した場合、CDDP の体内からの消失は遅延すると考えられる。#4 の血漿中 Pt の半減期は第 1 サイクルと比較して第 2 サイクルでは約 2 倍に延長したが、血清 CysC 濃度及び血清 Cr 濃度に大きな変動は認められなかった。一方、#1 において、血漿中 Pt の半減期は第 1 サイクルと第 2 サイクルで同等であったにもかかわ

らず、CDDP 投与後の血清 CysC 濃度及び血清 Cr 濃度は、開始前と比較して 250%もの変動が認められた。本研究では、CDDP 濃度ではなく Pt 濃度を測定しているため、CDDP あるいはその代謝物の薬物動態を直接評価できなかった。FP 療法開始後の血液検体の採取スケジュールが各被験者で異なっており、血清 CysC 濃度の上昇が治療期間を通して CDDP の薬物動態に影響を与えたかどうかは不明であり、更に Pt は腎尿細管分泌により体外へ排泄されるが、Pt の腎排泄に対して尿細管機能がどの程度寄与するかは不明である。これらのことから、本研究結果を適切に考察するためには更なる検討が必要であると考えられる。

以上、FP療法を施行した食道癌患者において、血清CysC濃度の変化からCDDPによる早期の腎機能低下を評価できることが示された。一方で、CDDP投与初期においては、血清CysC濃度は腎機能以外の要因でも変動した可能性を否定できないことから、CDDP投与初期に血清CysC濃度から腎機能を推定する場合は、腎機能を過小評価する可能性があると考えられた。

第5節 小括

食道癌術前化学療法あるいは術後補助化学療法としてFP療法を施行した食道癌患者6例を対象として、血漿中 Pt 濃度推移と血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度の相関解析に基づき、血清 CysC 濃度の変動要因を検討し、以下の結論を得た。

1. 全ての患者において、CDDP 投与後に一過性の血清 CysC 濃度の上昇が認められ、7～10 日後にベースライン値へ回復した。血清 Cr 濃度では同様の変動は認められなかった。
2. FP 療法の各サイクル開始時の血清 Cr 濃度に有意差は認められなかったが、血清 CysC 濃度では第1サイクル開始時と比較して第2サイクル開始時は有意に高値であった。
3. FP 療法開始時、第1サイクルと第2サイクルの白金の薬物動態パラメータに有意差は認められなかった。
4. CDDP 投与2日後の血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度の変動と血漿中 Pt 濃度の消失の間に相関が認められなかった。

以上、FP療法を施行した食道癌患者において、血清 CysC 濃度の変化から CDDP による早期の腎機能低下を評価できる可能性が示された。一方、CDDP 投与初期においては、血清 CysC 濃度は腎機能以外の要因でも変動する可能性が示されたことから、CDDP 投与初期に血清 CysC 濃度から腎機能を推定する場合、腎機能を過小評価する可能性があると考えられた。

第2章 血中白金濃度に及ぼす手術の影響

第1節 諸言

食道切除術のような大手術は、生体内において内分泌学的、免疫学的及び血液学的な変化を引き起こす^{35,36}。手術による侵襲は炎症性物質の放出を誘導し、それらにより毛細血管の破壊が起こり、血管内から細胞間隙へタンパク質が漏出する。このため、食道癌切除術後は血清 Alb 濃度が増加すると報告されている³⁶⁻³⁹。一方、周術期における麻酔導入は、腎血流量や糸球体濾過量を減少させる。従って、麻酔を使用する際は、一般的に血行動態を安定させるために低用量カテコラミンや利尿剤が使用される⁴⁰⁻⁴²。手術に伴うこのような生理的变化は、CDDP の薬物動態に影響を与える可能性を示唆するものである。

CDDP は主に腎臓から体外へ排泄される。血漿中の遊離体 CDDP は、投与後速やかに消失し、半減期は 30 分程度である。一方、血中の総 CDDP は相対的に半減期が長く、投与後も血漿中あるいは組織中に長期間滞留することが報告されている⁵⁻⁸。CDDP が体内に長期間滞留する要因の一つとして、CDDP と Alb のような血中タンパク質との結合が考えられており、化学療法後数カ月から数年間経過後も、血中に残存する Pt の 10%程度は活性体として存在することが報告されている⁷。また、Sprauten らは、長期間血清中に残存する Pt 濃度と CDDP による末梢神経障害や聴覚毒性の重篤度との関連を報告しており¹⁰、化学療法後に血清中に残存する Pt 濃度が遅発性副作用のマーカーになる可能性が示唆される。

本章では、術前 FP 療法を施行した食道癌患者を対象として、手術に伴う全身状態の変化が血中 Pt 濃度に及ぼす影響を検討することを目的として、周術期における血漿中 Pt 濃度推移と CRP、血清 Alb 濃度、血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度の変動との関連性について検討した。

第2節 方法

1. 対象と治療

本研究計画は、神戸大学医学部等医学倫理委員会の承認を得て実施した。術前FP療法施行後に胸腔鏡下食道亜全摘術を施行した患者を対象とした。食道癌と診断された6名の被験者から事前に文書による同意を取得した。Table 2-1に患者背景を示す。全被験者について、手術歴、甲状腺機能不全、ステロイド内服歴は認められなかった。FP療法は、CDDPの2時間の点滴投与（80 mg/m²/day, 1日目）と5-FUの5日間持続点滴投与（800 mg/m²/day, 1~5日目）とし、全被験者で計2サイクルを施行した。5例（#1~#5）は、第1章でPt濃度推移を評価した症例である。

2. 血液サンプル

EDTA処理あるいは非処理の採血管を用いて、各被験者の末梢静脈血（5 mL）を採取した。採血ポイントは、手術前、手術後1日目（POD1）、3-4日目（POD3-4）、7-8日目（POD7-8）、11-15日目（POD11-15）及び27-30日目（27-30）の計6ポイントとした。血漿はEDTA処理した採血管を用いて採血し遠心操作（10分間、1,900 g）により分離した。血清はEDTA非処理の採血管を用いて採血し遠心操作（7分間、1,800 g）により分離した。血漿及び血清は測定まで-40℃で保管した。CRP、Alb、Cr及びCysCの基準値は、それぞれ<0.3 mg/dL、4.1-5.0 g/dL、0.5-1.3 mg/dL及び0.53-0.95 mg/Lである。なお、検出限界以下の値は、ゼロと仮定して処理した。

3. 血漿中Pt濃度と血清CysC濃度の測定

第1章と同様である。

4. データ解析

各被験者の血漿中Pt濃度推移は、1-コンパートメントモデルにより解析し、薬物動態パラメータを算出した。1患者あたり術後計5サンプルの測定値に対し非線形最小二乗法（MULTI）²²を用いて解析した。薬物動態パラメータとして消失速度定数（ K_{el} ）及び半減期（ $t_{1/2}$ ）を算出した。POD1における血漿中Pt濃度の予測値は、術前FP療法の第2サイクルの薬物動態パラメータ⁴³を用いて算

出した。

5. 統計解析

CRP、Alb、Cr及びCysCのデータは中央値（四分位範囲）で示した。POD1における実測値と予測値の差は、Wilcoxon *t*-testで検定した。手術前と手術後の差は、nonparametric Friedman test 及び Steel–Dwass multiple comparison testで評価した。有意水準は両側5%とした。

第3節 結果

CDDP 最終投与から手術までの期間は、中央値（最小値-最大値）として 34 日（24-52 日）であった。全被験者は侵襲の少ない胸腔鏡下食道亜全摘術を施行された。術中の出血量は 80-890 mL であり、3 例で輸血が実施された（Table 2-1）。胸腔鏡下食道亜全摘術前後における CRP、血清 Alb 濃度、血清 Cr 濃度、血清 CysC 濃度を Fig.2-1 に示す。CRP について、POD1、POD3-4 及び POD7-8 における値は、それぞれ中央値（最小値-最大値）として 8.1(7.5-9.2)、4.0(3.2-11.0) 及び 4.6(1.9-5.7) であり、これらの値は術前 0.1（0.0-0.3）と比較して有意に高値であった。POD7-8 以降は、誤嚥性肺炎による高値（#5）を除き、正常範囲内へ回復した。Alb について、手術前の値は 5 例が基準値範囲内（4.0～4.4 g/dL）、1 例(#5)が正常値以下であった。手術後の値は、POD27-30 まで全被験者が正常値以下であった。術前の血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度について、#3 はそれぞれ 1.6 mg/dL 及び 1.4 mg/L と高値であり、腎機能障害が疑われたが、他の 5 例は正常範囲内であった。POD3-4 及び 7-8 における血清 Cr 濃度は、術前よりも低値を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。加えて、POD1 における血清 CysC 濃度の中央値（最小値-最大値）は 0.84 mg/L（0.72-1.03）であり、手術前、POD3-4、7-8、11-14 及び 27-30 よりも低値を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。

Table 2-1 Clinical characteristics of the patients

Patient No.	Age (years)	Gender	Interval between last CDDP administration and surgery (days)	Operative blood loss (mL)	Blood transfusion (mL)	Duration of dopamine administration (hours)
#1	50	Female	36	980	520	38
#2	55	Male	36	185	0	34
#3	72	Male	52	260	260	229
#4	70	Male	24	300	0	56
#5	76	Male	31	550	260	7
#6	52	Male	31	80	0	17
Mean	62.5	-	35.0	392.5	173.3	63.5
S.D.	11.4	-	9.4	327.7	212.2	82.9

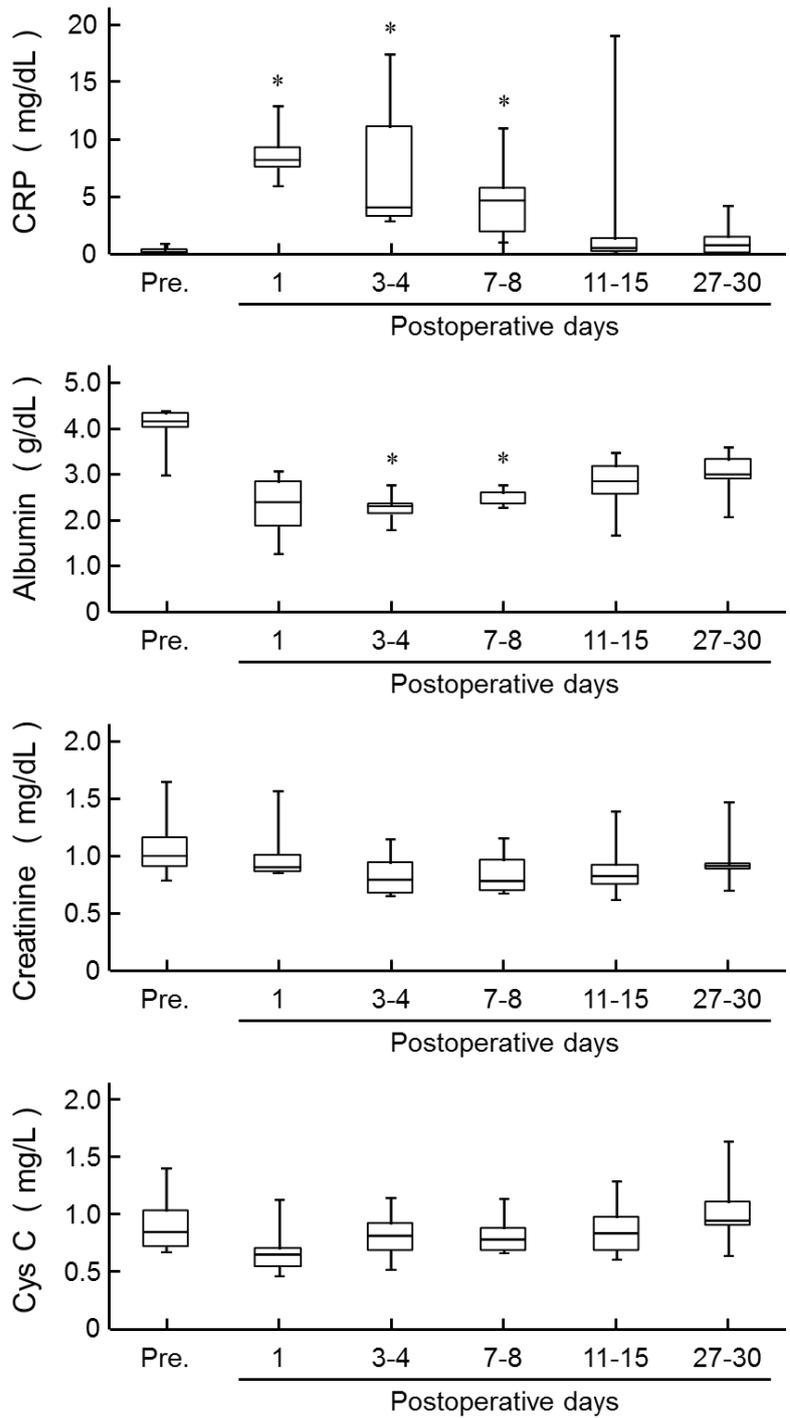


Fig. 2-1 Serum levels of CRP, albumin, creatinine, and CysC in the 6 patients before and after thoracoscopic esophagectomy. The first and third quartiles are at the ends of the box, the median is indicated with a horizontal line in the box, and the maximum and minimum are at the ends of the whiskers. Asterisks indicate statistically significant differences of $P < 0.05$ compared with preoperative values. *CRP*: C-reactive protein, *CysC*: cystatin C, *Pre*: pre-operation

Fig. 2-2 に全被験者の血漿中 Pt 濃度の推移を示した。血漿中 Pt 濃度は、各被験者で計 6 ポイント測定した。血漿中 Pt 濃度は、手術前の中央値（最小値-最大値）である 330 ng/mL（246-406）から手術 1 日後は 99 ng/mL（80-174）へと顕著に低下した。

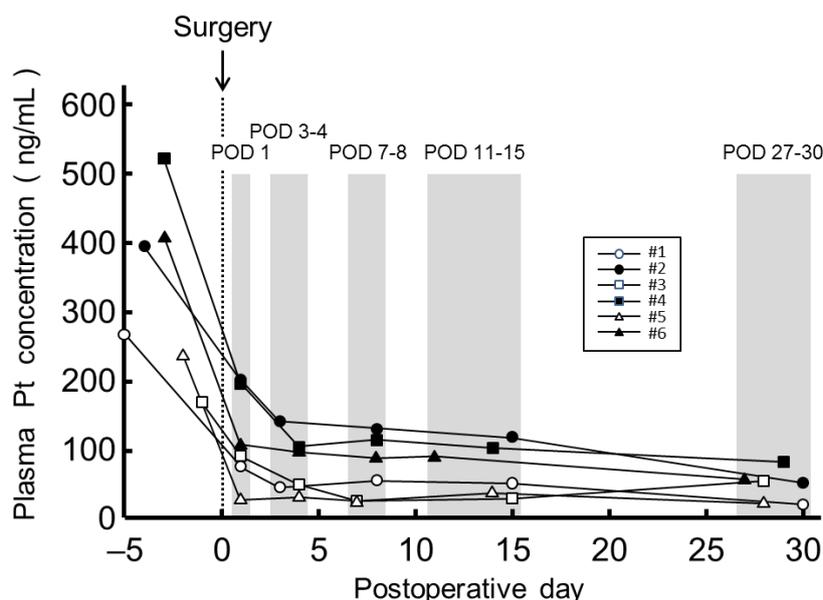


Fig. 2-2 Time-plasma Pt concentration profiles in the 6 patients before and after thoracoscopic esophagectomy. *Pt*: platinum, *POD*: postoperative day(s)

#6 を除く 5 例について、POD1 における血漿中 Pt 濃度の実測値 90 (76-196) ng/mL (中央値 (最小値-最大値)) は、予測値 184 (128-244) ng/mL よりも有意に低値であった ($P < 0.05$) (Table 2-2)⁴³。手術後の Pt の消失速度定数は、 0.0203 ± 0.0174 /日 (mean \pm SD) であり、我々が先の研究で算出した消失速度定数よりも低値であった (術前 FP 療法施行時の第 1 サイクル及び第 2 サイクルにおける消失速度定数は、それぞれ 0.0548 ± 0.0130 /日及び 0.0472 ± 0.0146 /日)⁴³。術後の消失速度定数は、手術前の FP 療法第 1 サイクルのそれと比較して有意な差を示したが ($P < 0.05$)、第 2 サイクルのそれと比較した場合、統計学的な有意差は認められなかった ($P = 0.07$)。POD1 以降、#3 を除く 5 例の被験者の血漿中 Pt 濃度は、わずかに減少した (半減期は中央値として 29 日)。手術前に腎機能障害が疑われた #3 では、手術後に同様に血漿中 Pt 濃度の低下が認められたが、低

用量ドパミン投与終了後に血漿中 Pt 濃度は増加した。

Table 2-2 Prediction of plasma Pt concentration on POD1

Patient No.	Predicted concentration ^a (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL)
#1	183.6	75.9
#2	244.3	202.6
#3	128.0	90.1
#4	443.9	195.5
#5	98.0	28.7
#6	Not applicable ^b	107.5
Mean	219.6	116.7
S.D.	137.3	77.0

a: The prediction of the plasma Pt concentration was performed using the individual pharmacokinetic parameters calculated in our previous study⁴³ (see Materials and Methods).

b: Patient #6 was not participated in our previous study⁴³.

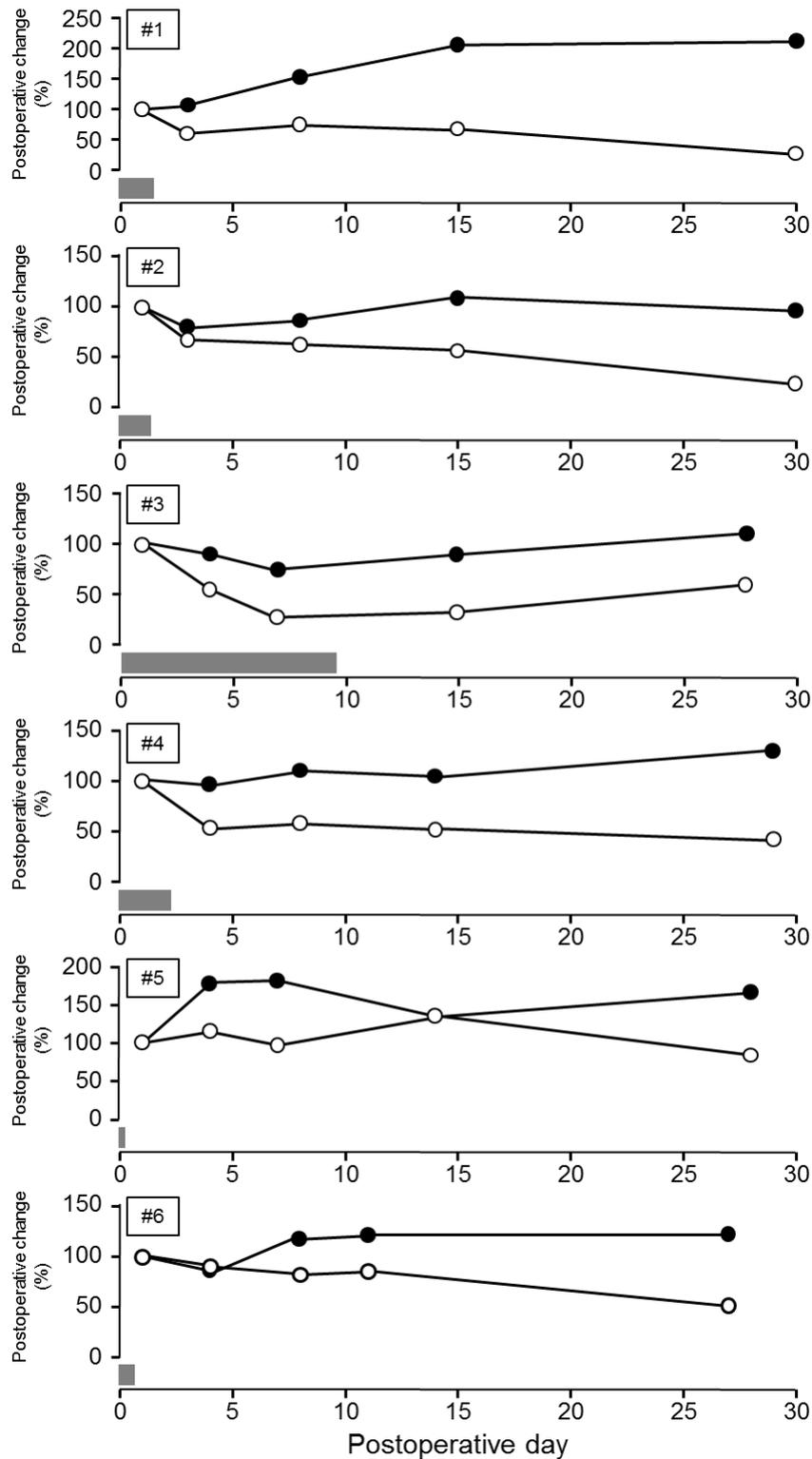


Fig. 2-3 Postoperative changes in plasma Pt (○) and serum Alb (●) concentrations. The data were processed individually for each patient as a percentage of the respective values on POD 1. The length of gray bar shows the duration of low-dose dopamine administration.

Pt: platinum, *Alb*: Albumin, *POD*: postoperative day

第4節 考察

本研究結果より、血漿中 Pt 濃度が手術前と比較して手術後に急激に低下すること及び血中からの Pt の消失速度が手術後に低下することが示された。Pt は主に腎臓から体外へ排泄される。CDDP の副作用を予測する際、血中濃度や腎機能をモニターすることは重要である。麻酔導入により、周術期は腎血流量が低下することから、一般的に血行動態を維持するために低用量ドパミンや利尿剤が使用される⁴⁰⁻⁴²。本研究においても、全ての被験者に対して手術後に速やかにドパミンが投与され、血清 Cr 濃度及び血清 CysC 濃度は低下傾向を示した。POD1 におけるこれらの変動を GFR に換算すると、それぞれ 1.1 倍、1.4 倍の増加に相当するものであった (Fig. 2-1)。5 例 (#1~#5) に対する血漿中 Pt 濃度推移は、第 1 章で評価した⁴³。POD1 における血漿中 Pt 濃度の実測値は、術前の薬物動態パラメータを用いた予測値の 0.54 倍であり、有意に低値であった ($P < 0.05$)。手術後に CDDP の蛋白結合率が変化せず、その消失が GFR に依存すると仮定した場合、手術後の腎機能の亢進 (GFR に換算して 1.4 倍) が血漿中 Pt 濃度に及ぼす影響は約 2% の低下にすぎず、手術後の腎機能の亢進は血漿中 Pt 濃度の低下の主な要因ではないと考えられた。また、手術後の血漿中 Pt 濃度の低下は、手術中の出血や輸血による可能性も考えられるが、これらと血漿中 Pt 濃度との間に相関は認められなかった (Table 2-1)。

手術による侵襲は、しばしば出血、全身炎症状態、組織間隙への体液の移行及び血管透過性亢進による低 Alb 血症を伴う³⁵⁻³⁹。POD1 における血清 Alb 濃度は手術前の 23-61% に低下した (Fig. 2-1)。手術前に血清 Alb 濃度が低値であった #5 は、Alb 値は手術によって更に低下した。手術後の血清 Alb 濃度低下の主な要因は、手術に伴う全身炎症状態により血管透過性が亢進したことで、血中の Alb が組織間隙へ移行したためと考えられる。また、POD1 における血漿中 Pt 濃度は、術前の薬物動態パラメータを用いた予測値の 0.54 倍であったことから、分布容積の増大が血漿中 Pt 濃度の低下の要因であると考えられた。加えて、血漿中の CDDP の 90% 程度は Alb との結合体で存在していることから、手術後の CDDP の分布容積の増大は、結合体 CDDP が Alb と共に血中から組織間隙へ移行したことが主な要因であると考えられた。また、手術後に血漿中 Pt 濃度の再上昇が観察された 5 例では、血清 Alb 濃度は上昇傾向を示した (Fig. 2-3)。このことから、手術後の血漿中 Pt 濃度の再上昇は、全身炎症状態によって血中から組織間隙へ移行した Alb が、炎

症状の回復に伴い再び血中へ移行する際に、結合体 CDDP が Alb とともに血中への移行したためであると推察された。

一方、一次消失を仮定した血漿中 Pt の半減期が手術後に延長する傾向を認めたことから、手術による全身炎症状態と血中の CDDP の長期滞留との関連が示唆された。Sprauten らは、長期間残存する血清中 Pt 濃度と神経障害の重篤度との関連を報告している¹⁰。本研究は症例数が少なく神経障害を発現した患者は認められなかったものの、CDDP の組織移行量の増大と長期滞留という観点から、全身炎症状態と CDDP による神経障害が関連する可能性が示唆された。

Alb は、血中と組織間における亜鉛や銅のような金属イオンの輸送に関与している⁴⁴⁻⁴⁶。また手術後は血漿あるいは血清中の亜鉛濃度が変化すると報告されていることから⁴⁷⁻⁴⁹、手術後の一過性の血漿中亜鉛濃度の低下と血漿中 Alb 濃度の変化との関連が示唆される。Hu らは、組み換え型ヒト Alb に対する CDDP の結合部位は亜鉛の結合部位と競合すること、CDDP は Alb に結合している亜鉛と置換することを報告している⁵⁰。LA-ICP-MS（レーザーアブレーション-誘導結合プラズマ-質量分析法）を用いた CDDP 処理したラットの腎臓に関する研究で、細胞内に蓄積した内因性の亜鉛が、投与された Pt によって置換されることが報告されている⁵¹。CDDP は主に腎臓に分布することから^{52,53}、上記のような手術による Pt の組織間隙への移行が、更に腎臓への蓄積を促進する可能性が示唆される。

CRP と CysC との関連について、大規模な横断研究において、CysC と CRP の変動について正の相関があると報告されている^{54,55}。一方で、Akerfeldt らは、手術後の CRP の上昇は血清 CysC の濃度変動に影響しないと報告している^{56,57}。本研究では、手術後に、CRP が一過性に上昇したが、血清 CysC 濃度は手術後増加せず、むしろ低用量ドパミンの使用により一過性に低下する傾向が認められた（Fig. 2-1）。これらのことから、胸腔鏡下食道亜全摘術後の血清 CysC 濃度は、CRP に比して腎血流量や糸球体濾過量の影響をより強く受けると考えられた。

以上、手術後の急激な血漿中 Pt 濃度の低下は、腎機能の亢進に比して、血中から組織間隙への Alb の移行に伴う結合体 CDDP の組織間隙への移行による影響が大きいと考えられた。また、手術後に血漿中 Pt の半減期が延長する傾向を認めたことから、手術による全身炎症状態と血中での CDDP の長期滞留との関連が示唆された。

第5節 小括

術前FP療法を施行した食道癌患者を対象として、手術に伴う全身状態の変化が血中Pt濃度に及ぼす影響を検討することを目的として、周術期における血漿中Pt濃度推移とCRP、血清Alb濃度、血清Cr濃度及び血清CysC濃度の変動との関連性について検討し、以下の結果を得た。

1. 手術後に著しい血漿中Pt濃度低下（中央値として、330 → 99 ng/mL）が認められた。
2. 血漿中Ptの半減期は、手術後に延長する傾向が認められた。
3. 手術後、低用量ドパミンの使用により腎機能の亢進が認められたが、腎機能亢進は手術後の血漿中Pt濃度低下の主な要因ではないと考えられた。
4. 手術時の出血と血漿中Pt濃度低下との間に相関は認められなかった。
5. 手術後の血清Alb濃度の低下は、手術に起因する全身炎症状態により血管透過性が亢進した結果、Albが血中から組織間隙へ移行したと推察された。

以上より、手術後の著しい血漿中Pt濃度の低下の主な要因は、腎機能の亢進に比して、血中から組織間隙へのAlbの移行に伴う結合体CDDPの組織間隙への移行による影響が大きいと考えられ、手術による全身炎症状態と血中のCDDPの長期滞留との関連が示唆された。

続いて、血清CysC濃度の変動要因に関する検討を行った。その結果を次章で詳述する。

第3章 培養癌細胞におけるシスタチンC分泌に及ぼすデキサメタゾンの影響

第1節 諸言

第1章で、CDDP投与後10日以内に血清CysC濃度が一過性に上昇する症例を経験した。この血清CysC濃度の変動は腎機能以外の要因による可能性が示唆され、その要因の1つとして薬剤による影響が考えられた。CDDPを含むがん化学療法を施行する際は、DEX、5-HT₃セロトニン受容体拮抗薬、アプレピタントといった制吐剤が前投薬される²⁵。CysCの腎機能マーカーとしての有用性を評価する際、これら併用薬剤による影響を検討することは極めて重要であると考えられる。中でも、ステロイドは血清CysC濃度に対して影響を与えることが報告されていることから^{58,59}、本章では、FP療法開始時に前投薬として使用されるDEXに着目し、CysC分泌量に対するDEXの影響について検討するとともに、CDDP、5-FU及びglucocorticoid receptor antagonistであるmifepristone (RU-486)の影響について検討した。

第2節 方法

1. Materials

DEX、5-FU 及び CDDP は、Wako Pure Chemical Industries(Osaka, Japan)から購入した。RU-486 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。2 - (4-iodophenyl) - 5- (2,4-disulfophenyl)- 2H - tetrazolium, monosodium salt (WST-1) と 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate は、Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)から購入した。

2. 細胞培養

実験には、食道癌由来KYSE150細胞、肺癌由来A549細胞、腎癌由来Caki-2細胞を用いた。KYSE150細胞とA549細胞は the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)から、Caki-2細胞は、Summit Pharmaceuticals International (Tokyo, Japan)より購入した。KYSE150細胞とCaki-2細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、100 U/mL penicillin G (Invitrogen)及び100 µg/mL streptomycin (Invitrogen)を含むRPMI-1640培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で培養した。A549細胞は、10% heat-inactivated FBS、100U/mL penicillin G (Invitrogen)及び100µg/mL streptomycin (Invitrogen)を含む Dulbecco's modified Eagle's培地 (DMEM; Invitrogen)にて培養した。細胞は、加湿、5% CO₂-95% air、37°Cの環境下で培養し、培養フラスコ中で播種した。0.05% trypsin-0.02% EDTA (Invitrogen)で細胞を剥離して継代を行った。

3. Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) 法による CysC 濃度の測定

細胞から培養液中への分泌されたCysCを定量するために、KYSE150細胞、A549細胞 及び Caki-2細胞を 1×10^6 cells/dish となるように播種し、各薬剤で処理する前に一晩培養した。各薬剤の濃度は、DEX、CDDP、5-FU 及び RU-486について、それぞれ100 nM, 10 µM, 2 µM及び 1 µMとした。DEX、CDDP 及び 5-FUの濃度は、臨床で使用される濃度に設定した^{28,31,43}。DEXによるCysC分泌に対する阻害効果を検証するために、DEXを含む培養液中に各薬剤を上記の濃度で添加した。コントロールは、薬剤非添加の環境で培養した。細胞播種24時間後にDEX (100 nM) を添加し、添加24、48及び72時間後に培養液を回収し、the Quantikine[®] Human Cystatin C Immunoassay kit

(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)を用いて、CysC濃度をELISA法により測定した。細胞は、phosphate-buffered saline (PBS)を用いて2回洗浄し、lysis buffer (Sigma-Aldrich)で回収した。細胞溶解液を室温で15分間攪拌した後、室温で15分間、13,000 gで遠心分離した。the bicinchoninic acid (BCA) Protein assay kit (Sigma-Aldrich)を用いて、総蛋白量をBCA法により定量した。培養液及び細胞溶解液は、ELISA 及び BCA assayを行うまで-20°Cで保管した。

4. WST-1 colorimetric assay

KYSE150 細胞について、DEX、CDDP 及び 5-FU による細胞毒性を WST-1 assay で評価した⁶⁰。細胞は 96-well plates 中に播種し、24 時間前培養した。培養液中に各薬剤を 1 種類ずつ、数種類の濃度を添加した。細胞は 37°C で 72 時間培養した。培養液を WST-1 を含む溶液と交換した後、3 時間後に microplate reader (SpectraFluor™; Tecan, Maennedorf, Switzerland)を用いて、630 nm を対照として 450 nm における吸光度を測定した。

5. 統計解析

各薬剤で処理した検体中のCysC分泌量は、コントロール群に対する百分率で示した。実験は少なくとも3回行い、データは平均値±標準誤差 (SE) で示した。Tukey-Kramer testで検定し、有意水準は両側5%とした。

第3節 結果

1. CysC分泌量に対するDEXの影響

DEXを添加したKYSE150細胞, A549細胞及びCaki-2細胞におけるCysC分泌量をFig. 3-1に示した。DEXを添加した細胞では、培養液中へCysC分泌量は経時的に増加した。KYSE150細胞について、CysC分泌量は、DEX未添加群と比較してDEX添加群は72時間後まで統計的に有意に高値であり、24時間後のCysC分泌量は特に高値を示した(それぞれ、 50.3 ± 2.5 及び 27.8 ± 1.4 ng/mL/mg protein) (Fig. 3-1A)。

A549細胞においても同様の結果を観察した (Fig. 3-1B)。しかし、Caki-2細胞では、24時間後のCysC分泌量はDEX未添加群と比較してDEX添加群で有意に高値であったが、48時間、72時間後では有意差は認められなかった (Fig. 3-1C)。

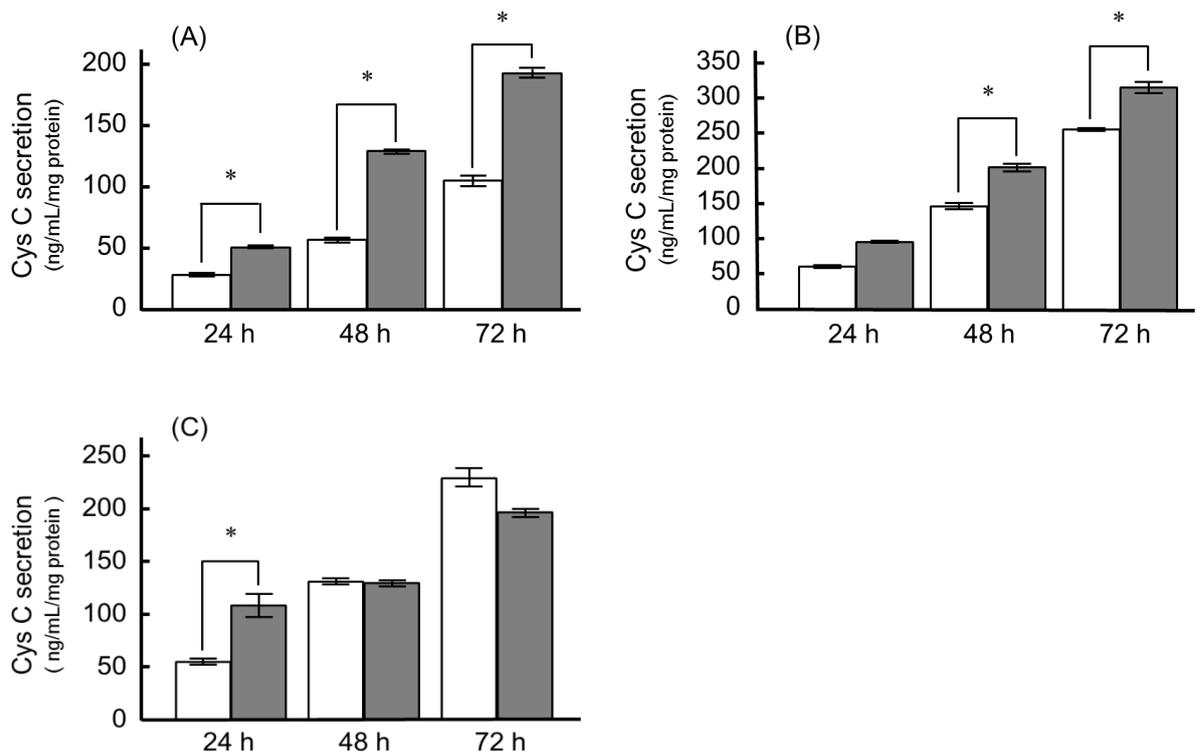


Fig. 3-1. Effect of DEX on secretion of CysC into culture medium from KYSE150 (A), A549 (B), and Caki-2 (C) cells. The cells were treated with (closed column) or without (open column) 100 nM DEX for 24 h, 48 h, and 72 h. Each column represents the average and standard error for at least 3 independent experiments. * Statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the value in untreated control cells.

次に、KYSE150細胞を用いて、CDDP、5-FU、RU-486単独及びDEX併用下におけるCysC分泌量を検討した。その結果をFig.3-2に示した。100 nM DEXで72時間処理した細胞はDEX未添加群と比較して、CysC分泌量が2.1倍増加した。DEX添加群では、10 μ M CDDP、2 μ M 5-FU存在下においても、CysC分泌量はそれぞれ1.9倍及び2.1倍増加した。一方、1 μ M RU-486 存在下では、DEX添加群及び未添加群ともにCysC分泌量は増加しなかった。5-FU単独群では、CysC分泌量は5-FU未添加群と比較して有意に低下した (66.5 \pm 4.0%)。CDDP及びRU-486単独群では、コントロール群と比較してCysC分泌量は変化しなかった。

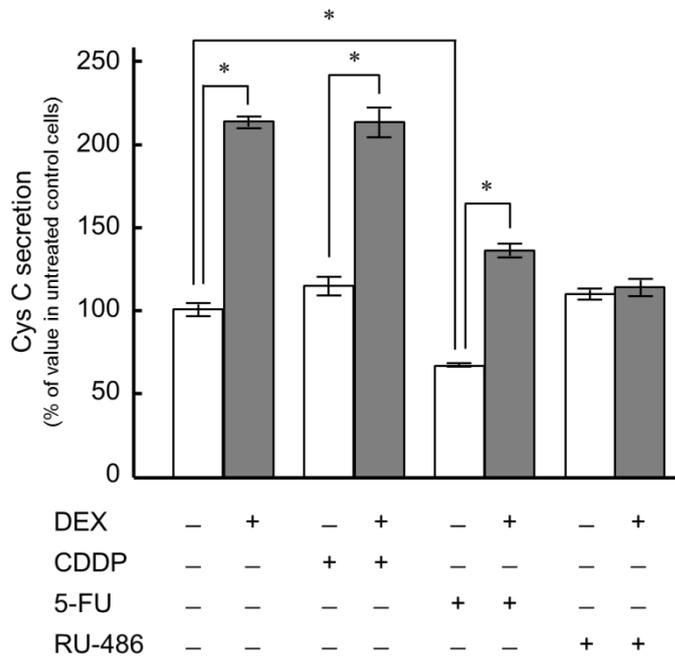


Fig. 3-2. Effects of CDDP, 5-FU, or RU-486 alone or in combination with DEX on secretion of CysC into culture medium from KYSE150 cells. KYSE150 cells were incubated with medium containing CDDP, 5-FU, or RU-486 alone (open column) or in combination with DEX (closed column) for 72 h. The final concentrations of the drugs during exposure were 100 nM, 10 μ M, 2 μ M, and 1 μ M for DEX, CDDP, 5-FU, and RU-486, respectively. The control cells were incubated with culture medium without drugs in each experiment. Each point represents the average and standard error for at least 3 independent experiments. *Statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the value in untreated control cells.

2. Cell viability analysis

KYSE150 細胞において、DEX、CDDP 及び 5-FU による細胞毒性を WST-1 法により検討した。100 nM DEX は細胞毒性を示さなかった (Fig. 3-3A)。CDDP 及び 5-FU では、濃度依存的に細胞生存率が低下し、10 μ M CDDP 及び 2 μ M 5-FU の濃度で、生存細胞数はコントロール群の 60%程度であった (Figs. 3-3B and C)。

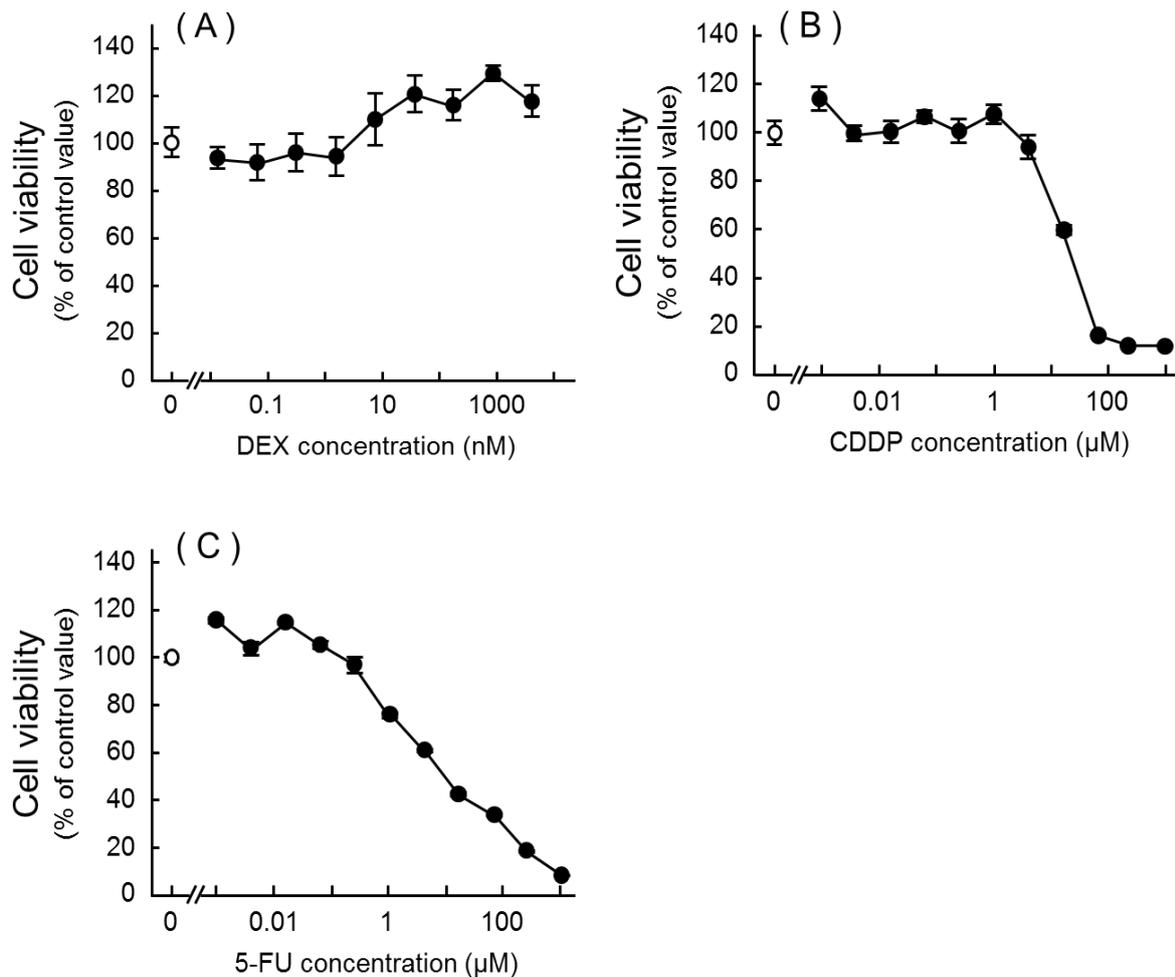


Fig. 3-3. Effects of DEX (A), CDDP (B) and 5-FU (C) on cell viability in KYSE150 cells. KYSE150 cells were incubated with medium containing DEX (0.01–4000 nM), CDDP (0.001–1024 μ M), or 5-FU (0.001–1024 μ M) for 72 h. Cell viability was evaluated by the WST-1 colorimetric assay. Each point represents the average and standard error for at least 3 independent experiments.

第4節 考察

本研究の結果、第1章で観察されたCDDP投与初期の血清CysC濃度の一過性の上昇の要因として、FP療法開始時に前投薬で使用されるDEXとの関連が示唆された (Fig. 3-1)。CDDP単独群あるいは5-FU単独群の場合と比較して、それらとDEXを併用した群ではCysC分泌量が有意に増加した。一方で、CysC分泌量について、CDDPあるいは5-FUとDEXを併用した群で相乗効果は認められなかった (Fig. 3-2)。CysC分泌に及ぼすDEXの影響について、Bjarnadóttirらは、HeLa細胞を用いた研究でCysC分泌がDEXにより増加する要因として、CysCをコードする遺伝子の転写プロモーター領域との関連を指摘している²⁶。本研究では、KYSE150細胞において、glucocorticoid receptor antagonistであるRU-486を用いて、CysC分泌量に対するDEXの作用機序を検討した。結果、RU-486はDEXを添加したKYSE150細胞のCysC分泌をほぼ完全に抑制したことから、CysC分泌量に対するDEXの作用機序は糖質コルチコイド受容体を介した転写阻害によるものと考えられた (Fig. 3-2)。加えて、DEXはアポトーシスを阻害することにより、いくつかの癌細胞で細胞増殖を促すことが報告されているが、CDDP及び5-FUはアポトーシスを誘導する⁶¹。DEX併用下におけるCysC分泌量増加の要因は、上述の転写過程における関与とともにアポトーシスの抑制との関連も示唆された。副腎皮質ホルモンは癌や免疫疾患等で幅広く使用されており、治療期間中は腎機能を正確に観察する必要がある。5-FU単独処理下では、CysC分泌量はコントロール群と比較して有意に低下したが、CDDP単独処理下では変化は認められなかった (Fig. 3-2)。CysC分泌量の差はCDDPと5-FUの細胞障害性の違いによる可能性が考えられる。WST-1法によるKYSE150細胞を用いたCDDP及び5-FUの細胞障害性に関する検討では、本研究で使用した濃度で処理した際に、いずれの薬剤もコントロール群と比較して細胞数が60%程度まで減少した (Figs. 3-3B and C)。すなわち、細胞障害性は5-FUに特異的ではなかったことから、細胞障害性とCysC分泌量の減少との関連性は不明である。

CysC housekeeping遺伝子は、全ての有核細胞に発現している⁶²。細胞外シスタチンは生体内に幅広く分布しており、ほとんどの体液中から検出される⁶³。CysCはカテプシンを標的としたシステインプロテアーゼ阻害剤の1種である³⁴。5-FUは、ヒト大腸癌細胞株を用いた研究でカテプシンBとカスパーゼの切断を起こし、カテプシンBの活性化が5-FUが誘導するアポトーシスに

関与することが報告されている³²。加えて、オートファジーは腫瘍形成を抑制する上で極めて重要であるが⁶⁴、5-FUはアポトーシスによる細胞死を誘導すると同時に、オートファジーによる生存能を活性化している³²。

CysCは神経細胞では通常培養条件でオートファジーを誘導し、その減少はオートファジーを抑制する方向に働くが⁶⁵、本研究で認めた5-FUによるCysC分泌の減少はアポトーシスによる細胞死を加速させることに寄与するかもしれない。ネクローシスは非アポトーシス性細胞死の重要な過程である⁶⁴。細胞死におけるアポトーシスと非アポトーシスの割合は、食道癌と大腸癌細胞等の細胞種によって異なる^{32,66}。加えて、CDDPと5-FUを併用した際、特定の細胞株では形態学的にアポトーシス優位となり、その他の細胞株では非アポトーシスが優位となる⁶⁶。本研究で用いた細胞株がどの程度アポトーシスおよび非アポトーシスを誘導したかは明らかではないが、細胞障害性の程度は、薬剤と癌種による細胞外CysC分泌の違いと関連しているかもしれない。この疑問点を解決するためには、フローサイトメトリーを用いたアポトーシス解析を行う必要があると考えられる。

生理学的・行動学的な日内変動は様々な内因性・外因性の因子により影響を受けることが知られている。DEXは末梢組織においてcircadian遺伝子の発現過程に一過性の変化を誘導することが報告されている⁶⁷。一方で、5-FUは時計遺伝子の発現過程を抑制する効果を有していることが報告されている⁶⁸。しかし、DEXが誘導するcircadian遺伝子発現の変化が、食道癌患者におけるCysCの細胞外分泌にどの程度影響するかは不明である。さらに、*in vitro*におけるDEXによるCysC分泌量の増加ならびに5-FUによるCysC分泌量の減少が、全身のCysC濃度にどの程度寄与するかについても明らかではなく、前投薬としてDEXとともに使用されたグラニセトロンやアプレピタントがCysC分泌に及ぼす影響に関しても検討する必要があると考えられる。

以上、食道癌由来KYSE150細胞において、DEXがCysCの分泌量に影響を及ぼすことが示され、DEX以外の糖質コルチコイドにおいてもCysCの分泌が亢進されることが明らかとなった。このことから、第1章で認められたCDDP投与初期における血清CysC濃度の一過性の上昇は、腎機能低下以外にFP療法開始時に前投薬として使用されるDEXとの関連が示唆された。

第5節 小括

第1章で観察されたCDDP投与初期の血清CysC濃度の一過性の上昇の要因を解明することを目的として、食道癌由来細胞を含む3種類（食道癌由来KYSE150細胞、肺癌由来A549細胞、腎癌由来Caki-2細胞）の培養細胞を用いて、CysC分泌量に対するDEXの影響を検討するとともに、CDDP、5-FU及びglucocorticoid receptor antagonistであるRU-486の影響について検討を行い、以下の結果を得た。

1. 用いた細胞において、CysC の細胞外分泌量は培養日数の経過にともない上昇し、DEX 添加によりその分泌量はさらに増加した。
2. DEX による CysC 分泌量の増加は、CDDP 及び 5-FU 併用の影響を受けなかった。
3. DEX による CysC 分泌量の増加は、RU-486 併用により完全に抑制された。
4. 臨床血中濃度では DEX による細胞毒性は認められなかった。

以上、食道癌由来 KYSE150 細胞において、DEX が CysC の分泌量に影響を及ぼすことが示され、DEX 以外の糖質コルチコイドにおいても CysC の分泌が亢進されることが明らかとなった。このことから、第1章で認められた CDDP 投与初期における血清 CysC 濃度の一過性の上昇は、腎機能低下以外に FP 療法開始時に前投薬として使用される DEX との関連が示唆された。

総括

シスプラチン(CDDP)は、固形癌に対して世界中で幅広く使用されている抗癌剤の1つである。しかし、投与後に発現する末梢神経障害や腎障害などの用量制限毒性が問題となり、治療完遂に至らないケースも認められる。CDDPは主に腎臓から体外へ排泄され、血漿中の遊離体CDDPは投与後速やかに消失するが、血漿中の総CDDPは相対的に半減期が長く、投与後も血漿中あるいは組織中に長期間滞留することが報告されている。加えて、血漿中に長期間残存する白金(Pt)濃度とCDDPによる末梢神経障害や聴覚毒性の重篤度との関連が報告されている。

シスタチンC(CysC)は、腎糸球体濾過によって体内から消失すること、その体内産生量が年齢、性別、筋肉量や運動などの影響を受けにくいことの原因から、クレアチニン(Cr)に代わる糸球体濾過速度マーカーとして期待されている。CDDPによる腎障害は近位尿細管を傷害することにより発現することが知られており、CDDPを含むがん化学療法施行時における腎機能低下を検出するマーカーとして、CysCはCrよりも優れていると報告されている。一方で、CysCは薬剤や炎症状態等の病態により影響を受けることから、その変動要因について検討する必要があると考えられる。

本研究では、CDDPの適正使用を目的として、食道癌に対する標準的治療法である5-FU/CDDP(FP)療法を取り上げ、血中Pt濃度推移と腎機能マーカーとの相関性ならびにそれらの変動要因について検討を行った。第1章ではFP療法施行時のPt、Cr及びCysCの血中濃度推移、第2章では血中Pt濃度に及ぼす手術の影響、第3章では培養癌細胞におけるCysC分泌に及ぼすDEXの影響について検討を行い、以下の結論を得た。

第1章：5-FU/CDDP療法施行時の白金、クレアチニン及びシスタチンCの血中濃度推移

食道癌術前化学療法あるいは術後補助化学療法としてFP療法を施行した食道癌患者6例を対象として、血漿中Pt濃度推移と血清Cr濃度及び血清CysC濃度との相関性にに基づき、血清CysC濃度の変動要因について検討した。FP療法は、5-FU(800 mg/m²) / CDDP(80 mg/m²) 2サイクルを1コースとして行なった。血清Crは、CDDP投与後7日以内に変動は認められなかった。一方、血清CysC

濃度は、全被験者において、第1サイクル、第2サイクルともにCDDP投与後7日以内に上昇（123%～143%）が認められ、10日程度でベースライン値へ回復した。また血清Cr濃度では各サイクル開始時に有意差は認められなかったが、血清CysC濃度では第1サイクル開始時と比較して第2サイクル開始時には有意な上昇が認められた。これらのことから、血清CysC濃度の変化から、CDDPによる早期の腎機能低下を評価できる可能性が示された。一方、CDDP投与2日後の血漿中Ptの消失と血清CysC濃度の変動の間に相関が認められなかったことから、CDDP投与初期においては血清CysC濃度は腎機能以外の要因でも変動する可能性が示唆された。この場合、血清CysC濃度を用いてGFRを推定すると、血清Crと比べて19%あるいはそれ以上に腎機能を低く見積もることが示唆された。

第2章：血漿中白金濃度に及ぼす手術の影響

手術に伴う全身状態の変化が血漿中Pt濃度に及ぼす影響を検討することを目的として、術前FP療法施行後に胸腔鏡下食道亜全摘術を施行した食道癌患者6症例を対象に、手術前後における血漿中Pt濃度、血清Cr濃度及び血清CysC濃度の変動について検討した。CDDP最終投与から手術までの期間は、中央値として34日であった。CRPの中央値は、手術前の0.13 mg/dLから手術7-8日後の8.3 mg/dLへと有意に上昇した（ $p<0.05$ ）。血漿中Pt濃度は、手術前の中央値である330 ng/mLから手術1日後の中央値である99.0 ng/mLへと顕著に低下したが、手術に伴う出血量や輸血量との間に相関は認められなかった。また、一次消失を仮定した血漿中Ptの半減期は手術後に延長する傾向を認めた。一方、血清Cr濃度および血清CysC濃度は手術後に低下する傾向を認めたが、手術前後において統計学的な有意差は認められず、これらの変動が血漿中Pt濃度に与える影響は小さいと考えられた。血清アルブミン（Alb）は手術前と比較して手術7日後まで有意な低下が認められた（ $p<0.05$ ）。術後のAlbの低下は、手術に伴う全身炎症状態により血管透過性が亢進したことで、Albが組織間隙へ移行したためと考えられた。血漿中のCDDPは90%程度がAlbとの結合体で存在していることから、手術後の急激な血漿中Pt濃度の低下は、腎排泄能の亢進に比して、血中から組織間隙へのAlbの移行に伴う結合体Ptの組織間隙への移行による影響が大きいと考えられ、手術による全身炎症状態と血中でのCDDPの長期滞留との関連が示唆された。

第3章：培養癌細胞におけるシスタチンC分泌に及ぼすデキサメタゾンの影響

血清 CysC 濃度はステロイド投与によって上昇することが報告されており、基礎的研究においても、デキサメタゾン (DEX) は子宮頸癌由来 HeLa 細胞からの CysC 細胞外分泌を亢進することが報告されている。そこで、FP 療法開始時に前投薬として使用される DEX に着目し、食道癌由来を含む 3 種類の培養細胞 (食道癌由来 KYSE150 細胞、肺癌由来 A549 細胞、腎癌由来 Caki-2 細胞) を用いて、細胞からの CysC 分泌量に対する DEX の影響について検討するとともに、CDDP、5-FU 及び glucocorticoid receptor antagonist である mifepristone (RU-486) の影響について検討を行った。用いた細胞において、CysC の細胞外分泌量は培養日数の経過にともない上昇し、DEX 添加によりその分泌量はさらに増加した。DEX による CysC 分泌量の増加は、CDDP 及び 5-FU 併用の影響を受けず、DEX による CysC 分泌量の増加は RU-486 併用によりほぼ完全に抑制された。また、食道癌由来 KYSE150 細胞において、臨床血中濃度では DEX による細胞毒性は認められなかった。以上のことから、第 1 章で観察された CDDP 投与初期の血清 CysC 濃度の一過性の上昇は、腎機能低下以外に FP 療法開始時に前投薬として使用される DEX との関連が示唆された。

本研究では、CDDP の適正使用を目的として、血漿中 Pt 濃度、血清中 Cr 及び CysC 濃度の相関解析に基づき、FP 療法施行時の長期 Pt 血中濃度推移と腎機能マーカーの相関性ならびにそれらの変動要因について検討を行った。その結果、FP 療法を施行した食道癌患者において、(1) 血清 CysC 濃度の変動に DEX が関与すること、(2) 血漿中 Pt 濃度は手術に伴う全身炎症状態により低下すること、を明らかにした。これらの成果は、血漿中 Pt 濃度及び血清 CysC 濃度が腎機能以外の要因で変動することを明らかにしたものである。(1) より、血清 CysC 濃度は腎機能の変化に加えて、糖質コルチコイド濃度によっても影響を受ける可能性があることから、ステロイド使用時は CysC を腎機能マーカーとして使用すべきではないと考えられた。(2) より、手術に伴う全身炎症状態によって、Pt の血中から末梢組織への移行量が増大することならびに全身炎症状態と CDDP の長期滞留との関連が示唆されたことは、CDDP による神経障害の発現要因の解明につながる有用な知見であると考えられた。

以上のことから、本研究成果は CDDP の適正使用に貢献できるものと考えられる。

謝辞

終わりに鑑み、本研究に際して終始御懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学代謝分析学分野 安井裕之教授、姫路獨協大学薬学部 中村 任教授ならびに神戸大学大学院医学研究科 平井みどり教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、本論文提出に際し、種々の御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学臨床薬学教育研究センター 矢野義孝教授ならびに臨床薬学分野 西口工司教授に深謝いたします。

また様々な有益なご助言とご指導を賜りました姫路獨協大学薬学部 山脇知佳助手、神戸大学医学部附属病院検査部 東口佳苗臨床検査主任技師、小林曜子臨床検査技師ならびに神戸大学医学部附属病院薬剤部諸氏に深謝いたします。

引用文献

1. 厚生労働省. 人口動態統計 (1947~2011年) . (2013).
2. Madias, N.E. & Harrington, J.T. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* **65**, 307-314 (1978).
3. Kintzel, P.E. & Dorr, R.T. Anticancer drug renal toxicity and elimination: dosing guidelines for altered renal function. *Cancer Treat Rev* **21**, 33-64 (1995).
4. Brydoy, M., *et al.* Observational study of prevalence of long-term Raynaud-like phenomena and neurological side effects in testicular cancer survivors. *J Natl Cancer Inst* **101**, 1682-1695 (2009).
5. Nagai, N., *et al.* Relationship between pharmacokinetics of unchanged cisplatin and nephrotoxicity after intravenous infusions of cisplatin to cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* **39**, 131-137 (1996).
6. Tothill, P., Klys, H.S., Matheson, L.M., McKay, K. & Smyth, J.F. The long-term retention of platinum in human tissues following the administration of cisplatin or carboplatin for cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* **28A**, 1358-1361 (1992).
7. Brouwers, E.E., Huitema, A.D., Beijnen, J.H. & Schellens, J.H. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clin Pharmacol* **8**, 7 (2008).
8. DeConti, R.C., Toftness, B.R., Lange, R.C. & Creasey, W.A. Clinical and pharmacological studies with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* **33**, 1310-1315 (1973).
9. von Schlippe M, F.C., Harland SJ. Cisplatin neurotoxicity in the treatment of metastatic germ cell tumour : time course and prognosis. *Br J Cancer*. **85**, 823-826 (2001).
10. Sprauten, M., *et al.* Impact of long-term serum platinum concentrations on neuro- and ototoxicity in Cisplatin-treated survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol* **30**, 300-307 (2012).
11. Štabuc, B., Vrhovec, L., Štabuc-Šilih, M. & Cizej, T.E. Improved prediction of decreased creatinine clearance by serum cystatin C: use in cancer patients before and during chemotherapy. *Clin Chem* **46**, 193-197 (2000).
12. Ando, N., *et al.* A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell Carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol* (2011).
13. Ando, N., *et al.* Surgery plus chemotherapy compared with surgery alone for localized squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a Japan Clinical Oncology Group Study--JCOG9204. *J Clin Oncol* **21**, 4592-4596 (2003).
14. Chew, J.S., Saleem, M., Florkowski, C.M. & George, P.M. Cystatin C--a paradigm of evidence based laboratory medicine. *Clin Biochem Rev* **29**, 47-62 (2008).
15. Newman, D.J. Cystatin C. *Ann Clin Biochem* **39**, 89-104 (2002).
16. Filler, G., *et al.* Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin Biochem* **38**, 1-8 (2005).
17. Schmitt, A., *et al.* A universal formula based on cystatin C to perform individual dosing of

- carboplatin in normal weight, underweight, and obese patients. *Clin Cancer Res* **15**, 3633-3639 (2009).
18. Tanaka, A., *et al.* Population pharmacokinetic analysis of vancomycin using serum cystatin C as a marker of renal function. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 778-782 (2010).
 19. Benohr, P., Grenz, A., Hartmann, J.T., Muller, G.A. & Blaschke, S. Cystatin C--a marker for assessment of the glomerular filtration rate in patients with cisplatin chemotherapy. *Kidney Blood Press Res* **29**, 32-35 (2006).
 20. Bárdi, E., *et al.* Cystatin C is a suitable marker of glomerular function in children with cancer. *Pediatr Nephrol* **19**, 1145-1147 (2004).
 21. Adhim Z, L.X., Huang W, Morishita N, Nakamura T, Yasui H, Otsuki N, Shigemura K, Fujisawa M, Nibu K, Shirakawa T. E10A, an adenovirus carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Gene Ther* **19**, 144-152 (2012).
 22. Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. & Uno, T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* **4**, 879-885 (1981).
 23. Hoek, F.J., Kemperman, F.A. & Krediet, R.T. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 2024-2031 (2003).
 24. Keevil, B.G., Kilpatrick, E.S., Nichols, S.P. & Maylor, P.W. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chem* **44**, 1535-1539 (1998).
 25. Kris, M.G., *et al.* American Society of Clinical Oncology guideline for antiemetics in oncology: update 2006. *J Clin Oncol* **24**, 2932-2947 (2006).
 26. Bjarnadottir, M., Grubb, A. & Olafsson, I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest* **55**, 617-623 (1995).
 27. Takahashi, T., *et al.* Pharmacokinetics of aprepitant and dexamethasone after administration of chemotherapeutic agents and effects of plasma substance P concentration on chemotherapy-induced nausea and vomiting in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**, 653-659 (2011).
 28. Nakade, S., *et al.* Population pharmacokinetics of aprepitant and dexamethasone in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**, 75-83 (2008).
 29. Fehrenbacher, N., *et al.* Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res* **68**, 6623-6633 (2008).

30. Seo, H.R., Bae, S. & Lee, Y.S. Radiation-induced cathepsin S is involved in radioresistance. *Int J Cancer* **124**, 1794-1801 (2009).
31. Miki, I., *et al.* Circadian variability of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and CLOCK T3111C genetic polymorphism in patients with esophageal carcinoma. *Ther Drug Monit* **27**, 369-374 (2005).
32. Bijnsdorp, I.V., Peters, G.J., Temmink, O.H., Fukushima, M. & Kruyt, F.A. Differential activation of cell death and autophagy results in an increased cytotoxic potential for trifluorothymidine compared to 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Int J Cancer* **126**, 2457-2468 (2010).
33. Martino, S., *et al.* Coordinated involvement of cathepsins S, D and cystatin C in the commitment of hematopoietic stem cells to dendritic cells. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 775-783 (2011).
34. Grzonka, Z., *et al.* Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* **48**, 1-20 (2001).
35. Desborough, J.P. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* **85**, 109-117 (2000).
36. Wang, L.S., *et al.* Effects of en bloc esophagectomy on nutritional and immune status in patients with esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* **67**, 90-98 (1998).
37. Fleck, A., *et al.* Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury. *Lancet* **1**, 781-784 (1985).
38. Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Conzen, P. & Rehm, M. A rational approach to perioperative fluid management. *Anesthesiology* **109**, 723-740 (2008).
39. Ryan, A.M., *et al.* Association of hypoalbuminemia on the first postoperative day and complications following esophagectomy. *J Gastrointest Surg* **11**, 1355-1360 (2007).
40. Goldberg, L.I. Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacol Rev* **24**, 1-29 (1972).
41. Marik, P.E. Low-dose dopamine: a systematic review. *Intensive Care Med* **28**, 877-883 (2002).
42. Nigwekar, S.U., Navaneethan, S.D., Parikh, C.R. & Hix, J.K. Atrial natriuretic peptide for management of acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 261-272 (2009).
43. Kume, M., *et al.* Transient elevation of serum cystatin C concentrations during perioperative cisplatin-based chemotherapy in esophageal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* **69**, 1537-1544 (2012).
44. Blindauer, C.A., *et al.* Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin. *J Biol Chem* **284**, 23116-23124 (2009).
45. Stewart, A.J., Blindauer, C.A., Berezenko, S., Sleep, D. & Sadler, P.J. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3701-3706 (2003).

46. Lu, J., Stewart, A.J., Sadler, P.J., Pinheiro, T.J. & Blindauer, C.A. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochem Soc Trans* **36**, 1317-1321 (2008).
47. Fraser, W.D., *et al.* Changes in iron, zinc, and copper concentrations in serum and in their binding to transport proteins after cholecystectomy and cardiac surgery. *Clin Chem* **35**, 2243-2247 (1989).
48. Puri, P., Kenny, D. & Guiney, E.J. The need to consider changes in plasma proteins in interpreting post-operative plasma zinc changes. *Clin Chim Acta* **110**, 341-344 (1981).
49. Myers, M.A., *et al.* Early plasma protein and mineral changes after surgery: a two stage process. *J Clin Pathol* **37**, 862-866 (1984).
50. Hu, W., *et al.* The anticancer drug cisplatin can cross-link the interdomain zinc site on human albumin. *Chem Commun (Camb)* **47**, 6006-6008 (2011).
51. Moreno-Gordaliza, E., *et al.* Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies. *Anal Chem* **83**, 7933-7940 (2011).
52. Stewart, D.J., *et al.* Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum. *Cancer Chemother Pharmacol* **10**, 51-54 (1982).
53. Holding, J.D., Lindup, W.E., Bowdler, D.A., Siodlak, M.Z. & Stell, P.M. Disposition and tumour concentrations of platinum in hypoalbuminaemic patients after treatment with cisplatin for cancer of the head and neck. *Br J Clin Pharmacol* **32**, 173-179 (1991).
54. Stevens, L.A., *et al.* Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney Int* **75**, 652-660 (2009).
55. Knight, E.L., *et al.* Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* **65**, 1416-1421 (2004).
56. Akerfeldt, T., Helmersson, J. & Larsson, A. Postsurgical inflammatory response is not associated with increased serum cystatin C values. *Clin Biochem* **43**, 1138-1140 (2010).
57. Grubb, A., *et al.* Cystatin C, a marker for successful aging and glomerular filtration rate, is not influenced by inflammation. *Scand J Clin Lab Invest* **71**, 145-149 (2011).
58. Risch L, H.R., Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem.* **47**, 2055-2059 (2001).
59. Manetti L, G.M., Pardini E, Grasso L, Lupi I, Linda Morselli L, Pellegrini G, Martino E. Early effects of methylprednisolone infusion on serum cystatin C in patients with severe Graves' ophthalmopathy. *Clin Chim Acta.* **356**, 227-228 (2005).
60. Takara K, F.M., Minegaki T, Yamamoto K, Takahashi M, Yokoyama T, Okumura K. Treatment schedule-dependent effect of 5-fluorouracil and platinum derivatives in colorectal cancer cells. *Eur J Pharm Sci.* **45**, 272-281 (2012).
61. Zhang, C., *et al.* Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour

- cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol* **29**, 1295-1301 (2006).
62. Abrahamson M, *et al.* Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J*. **268**, 287-294 (1990).
63. Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G. & Grubb, A. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem* **261**, 11282-11289 (1986).
64. Mathew R, Karantza-Wadsworth V & E., W. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. **7**, 961-967 (2007).
65. Tizon B, *et al.* Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. *PLoS One*. **5**, e9819 (2010).
66. O'Donovan TR, O'Sullivan GC & SL., M. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy*. **7**, 509-524 (2011).
67. Balsalobre, A., *et al.* Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344-2347 (2000).
68. Terazono H, *et al.* Modulatory effects of 5-fluorouracil on the rhythmic expression of circadian clock genes: a possible mechanism of chemotherapy-induced circadian rhythm disturbances. *Biochem Pharmacol*. **75**, 1616-1622 (2008).