

合機構による適格性確認において、ヒト腎障害への外挿性という観点からさらなる評価が必要とされている。メタボローム BM は、プロテオーム BM のさらに下流で表現型発現に直結しており、種特異性が低いことから、非臨床から臨床まで適用可能な薬物性腎障害の BM となりうると期待される。

本研究は、非臨床段階において、腎障害発症の指標となりうる内在性分子候補を探索すると共に、その BM 候補としての選定において、適格性に影響を及ぼす重要な因子の解明により、BM の標準的評価法を構築することを目的とした。今年度は、薬物性腎障害モデル動物の血液のメタボローム解析で有意差が認められる代謝物を探索すると共に、BM 候補として絞り込む際の評価法を標準化するための検討を開始した。本研究の遂行を通じて、薬物性腎障害を予測・評価しうる代謝物 BM の候補の選定や、その過程で見いだされる問題点とその解決法等の副作用 BM 評価手法の開発につながる知見が得られると期待される。

## B. 研究方法

### B.1 動物モデルの作製とメタボローム解析サンプルの調製

腎障害動物モデルの作製は、株式会社シミックバイオリサーチセンター研究本部（分担研究者：小松弘幸先生）で行われた。6 週齢の雄性 CrI:CD(SD)ラット（1 群 8 匹）に、用量依存的に急性尿細管壊死を惹起する 3 種の薬剤、ゲンタマイシン、シスプラチン、及びアムホテリン B を投与し、腎障害モデルを作製した。対照として、生理食塩水を投与したラットを用いた。各薬剤は、すでにラットで腎障害を引き起こすことが報告されている投与量・投与経路で投与し、ゲンタマイシンは 50 mg/kg（低用量）、200

mg/kg（高用量）を 4 日連続皮下投与、シスプラチンは、4 mg/kg を単回尾静脈内投与、アムホテリン B は 50 mg/kg を腹腔内投与とした。薬剤投与前（0 時間）、及び最終投与から 6、24、96 時間後、無麻酔下で頸静脈から血液約 1 mL を採取し、常法に従って血清を分離した。

### B.2 脂質抽出・メタボローム測定

ラット血清・血漿（各 100  $\mu$ L）から、内部標準物質 (IS) 存在下、Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出した。グリセロリン脂質 (Glycerophospholipids, GPL)・スフィンゴ脂質 (Sphingolipids, SL)・中性脂質等の脂溶性の高い代謝物を含む画分を、超高性能液体クロマトグラフー飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOFMS、超高性能液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、飛行時間型質量分析計は waters 社 LCT Premier XE) を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。

### B.3 データ解析

UPLC-TOFMS により得られたデータは、2DICAL（三井情報株式会社）を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保持時間、精密質量及びマススペクトルのデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、内部標準物質 (IS) により補正を行った全ピークの height 値を用いた。同定した各脂質につき、投与前のサンプルの平均値に対する投与後の各サンプルの値の比を投与薬剤ごとに算出した。この比を用いて、主成分判別分析 (PLS-DA) を行い (SIMCA-P+ 12, Umetrics, Umea, Sweden)、投与薬剤ごとに投与前に対する投与後の各時間における脂質プロファイルの違いや個体間変動を把握した。さらに、算出した比を  $\log_2$  変換し、その平均値を用いて全薬剤の k-means cluster を実施した。

クラスター解析には Cluster 3.0 (run 数: 1000、Similarity Metric: uncentered Correlation、Java TreeView にて画像を表示・保存) を使用した。さらに two-way ANOVA による統計解析を行い、 $p < 0.05$  を有意な差と判定した。

#### <倫理面への配慮>

動物実験は、各実施機関における「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物実験委員会の承認のもと、実験を行った。

### C. 研究結果

#### C.1 腎障害ラット血清中で同定された脂質

腎障害モデル、及び対照ラットの血清サンプルから、UPLC-TOFMS の陰イオンモードで 126 種のグリセロリン脂質、スフィンゴ脂質が同定された。表 1 に各クラスで同定された分子種数を示した。

#### C.2 各薬剤による腎障害ラット血清中の脂質プロファイルの変動

各同定脂質につき、投与前のサンプル平均値に対する投与後の各サンプルの値の比を用いて薬剤ごとに PLS-DA 解析を行った結果を図 1 に示す。

ゲンタマイシン低用投与ラット (図 1-A) 及び高用量投与ラット (図 1-B) において、投与後 6 時間採血群が、投与前採血群及び投与後 24 時間採血群及び 96 時間採血群と第一主成分により分離されたことから、投与後 6 時間採血群は、投与前採血群に対する脂質の変動率が、その他とは大きく異なることが推察された。

シスプラチン投与ラット (図 1-C) においては、投与後 6 時間採血群が、第二主成分により投与前採血群及び投与後 24 時間採血群及び 96 時間採血群と分離された。第一主成分による各

サンプルの分離は、各投与時間群には依存しなかった。

アムホテリシン B 投与ラット (図 1-D) では、第一主成分により、投与後 6 時間採血群及び投与後 24 時間採血群の一部のサンプルが、投与前採血群及び投与後 96 時間採血群と分離した。さらに、第二主成分により投与前採血群と投与後採血群 (6, 24, 96 時間) が分離した。よって、アムホテリシン B 投与ラットでは、他の薬剤投与ラットと比較して、投与前採血群に対する投与後採血群の脂質変動が顕著であることが示唆された。さらに、アムホテリシン B 投与ラットでは、他の薬剤と同様に、投与前採血群と比較して投与後 6 時間採血群に特異的に大きく変動する脂質が存在すると共に、他の薬剤とは異なり、投与後採血群すべて (6, 24, 96 時間) において、投与前採血群と比較して変動する脂質が存在することが推察された。

一方、生理食塩水投与ラットにおける投与前群及び投与後採血群の PLS-DA 解析 (図 1-E) においても投与後 6 時間採血群が、投与前採血群及び投与後 24 時間採血群及び 96 時間採血群と第一主成分により分離された。このことより、投与後 6 時間採血群は、薬剤非投与の対照群であっても、その血清中の脂質のプロファイルが他の群とは異なることが明らかになり、その原因としては、本群の絶食時間 (6 時間) が他の群の絶食時間 (24 時間) と異なることが大きく影響していると推察された。よって、薬剤投与後 6 時間後に変動する血清中の脂質から腎障害バイオマーカー候補を同定する際には、対照群である生理食塩水投与群との比較を行い、対照群で変動する脂質は除外すべきと考えられた。

#### C.3 全薬剤による腎障害ラット血清中の脂質

## 変動に関するクラスター解析

各薬剤の PLS-DA 解析の結果より、各薬剤による血清中の腎障害 BM 候補を探索するには、薬剤投与群で変動する脂質分子種のうち、対照群で変動する脂質の影響を排除し、かつ、全薬剤共通または各薬剤特異的に変動する脂質分子種を探索することが必要と考えられた。上記の条件を満たす脂質分子を探索するため、各同定脂質分子につき、投与前のサンプル平均値に対する投与後の各サンプルの値の比を  $\log_2$  変換した後、各群の平均値を算出し、その値を用いて全薬剤の k-means cluster を実施した (図 2)。

126 種の脂質分子は 5 つのクラスターに分割された。クラスター 1、3、4 に属する脂質分子は、投与後時間経過において対照群と薬剤投与群で同様の変動を示したことから、腎障害の BM 候補分子からは除外された。このうちクラスター 3 に含まれる脂質分子は、生理食塩水投与対照群及び薬剤投与群に関わらず、投与後 6 時間群で投与前群と比較して増加しており、絶食時間の違いに起因すると考えられた。一方で、クラスター 2 に属する脂質分子は、アムホテリシン B 投与ラットにおいて、投与後のすべての時間群において投与前群と比較して増加する脂質分子群であり、対照群とは異なる変動を示した。このクラスターに属する脂質分子の一部は、ゲンタマイシン高容量投与ラットの投与後 24 時間群においても投与前と比較して増加する傾向が認められた。クラスター 5 に属する分子群は、アムホテリシン B 投与ラットにおいて、投与後 6、24 時間群において投与前群と比較して増加する脂質分子群であった。クラスター 2 及びクラスター 5 に属する代表的な脂質分子種の変動を図 3 に示した。

今回のクラスター解析では、ゲンタマイシン、

シスプラチン投与ラットについては、対照群とは異なる変動を示し、かつ投与前群と比較して顕著な増減を認める脂質分子群を見出せなかった。さらに、全薬剤投与群に共通して、対照群とは異なる変動で投与前と比較して増加または減少する脂質分子種は見出せなかった。

## D. 考察

薬物性腎障害を引き起こすことが知られている 3 種の薬剤の投与により作製した腎障害モデルラットの血清中において変動する脂質代謝分子種を、多変量解析 (PLS-DA) 及びクラスター解析 (k-means cluster) を用いて探索した。各脂質分子種レベルにつき、投与前に対する投与後の変動率を用いた多変量解析により、すべての薬剤において投与後 6 時間群の変動率が他の投与時間群と比較して大きく異なることが示されたが、同様の変動が対照群でも認められ、クラスター解析においても腎障害特異的な BM 候補ではないことが示された。一方、アムホテリシン B 投与ラットにおいては、多変量解析により対照群とは異なる変動を示す血清脂質分子種の存在が示唆され、クラスター解析により分子種が同定された。アムホテリシン B による腎障害で有意に変動した脂質分子に関しては、各分子種の変動の時間推移を基に、病理変化や既知の BM との比較を行い、BM 候補になりうるかを検討する予定である。さらに腎組織や尿中のメタボローム解析を行い、血清中の変動脂質分子種と比較することも、BM 候補の同定に有用と考える。

## E. 結論

薬物性腎障害・肝障害モデル動物の血液のメタボローム解析を行い、対照群と比較して有意差が認められる代謝物を探索すると共に、バイ

オマーカー候補として絞り込む際の評価法を標準化するための検討を開始した。アムホテリシンBによる薬物性腎障害モデルラットの血清中で対照群と比較して有意に異なる変動を示す脂質分子種を見出した。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

- 1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y.: Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci.*, 2014; 141: 377-386.
- 2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Effects of sex, age, and fasting conditions on plasma lipidomic profiles of fasted sprague-dawley rats. *PLoS One.*, 2014; 9: e112266.
- 3) Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y. Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations. *Metabolomics*, 2014; 10: 402-413.
- 4) 前川京子, 佐井君江: 薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型とその人種差. *ファルマシア*, 2014; 50(7): 669-673.

##### 学会発表等

- 1) Saito Y, Saito K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Inoue M, Kumagai Y, Pappan K,

Maekawa K.: Metabolomic profiles in rat blood vary between genders, ages and fasting conditions, and their qualitative comparisons with human samples. 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition (2014. 11 San Diego, CA, USA).

- 2) Saito K, Urata M, Toyoshima K, Ishikawa M, Murayama M, Tajima Y, Senoo Y, Takemoto K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y.: Comparison of plasma lipidomic profile of humans with preclinical animals. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 3) Maekawa K, Saito K, Pappan K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Murayama M, Kumagai Y, Saito Y.: Impact of gender, age, fed/fasted state of rats on their serum hydrophilic metabolites. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 4) Ishikawa M, Saito K, Uebanso T, Maekawa K, Senoo Y, Murayama M, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Fujii M, Shibasaki Y, Yoneyama H, Nammo T, Saito Y, Yasuda K.: Characterization of hepatic lipid profiles of insulin-dependent NASH and following cirrhosis using mouse model. (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 5) Maekawa K, Saito K, Ishikawa M, Minamino M, Kumagai Y, Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint symposium (2014. 11, Busan, Korea).
- 6) 斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 児玉進, 熊谷雄治、

前川京子：ヒト試料を用いたバイオマーカー研究のためのレギュラトリーサイエンス. 第 35 回日本臨床薬理学会学術総会 (2014. 12, 愛媛)

- 7) 前川京子, 水澤精穂, 北本綾, 北本卓也, 中村亮介, 杉山永見子, 上田真由美, 外園千恵, 池田浩子, 矢上晶子, 松倉節子, 木下茂, 村松正明, 古谷博和, 高橋幸利, 松永佳世子, 相原道子, 関根章博, 日本 PGx データサイエンスコンソーシアム, 斎藤嘉朗. 日本人におけるカルバマゼピン誘因性

薬疹発症の危険因子 HLA-A\*31:01 のサロゲートマーカー多型を対象としたタイピング系の構築. 日本薬学会 135 回年会 (2015. 3, 神戸)

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. UPLC-TOFMSの陰イオンモード同定された脂質分子種

Lipid types	Detected ion mode	Lipid classes	Number of molecules
Glycerophospholipid	Negative	lysophosphatidylcholine (LPC)	8
		lysophosphatidylethanolamine (LPE)	1
		phosphatidylcholine (PC)	45
		ether-type PC (ePC)	7
		phosphatidylethanolamine (PE)	6
		ether-type PE (ePE)	12
		phosphatidylinositol (PI)	15
Sphingolipid	Negative	sphingomyelin (SM)	19
		ceramide (Cer)	8
		hexosylceramide (HexCer)	5
Total			126

図1. PLS-DA解析を用いた各薬剤による腎障害ラット血清中の脂質プロファイルの変動

A, ゲンタマイシン低用量 (GLo), B, ゲンタマイシン高用量 (GHI), C, シスプラチン (P), D, アムホテリジンB (A), E, 生理食塩水投与対照群 (C)

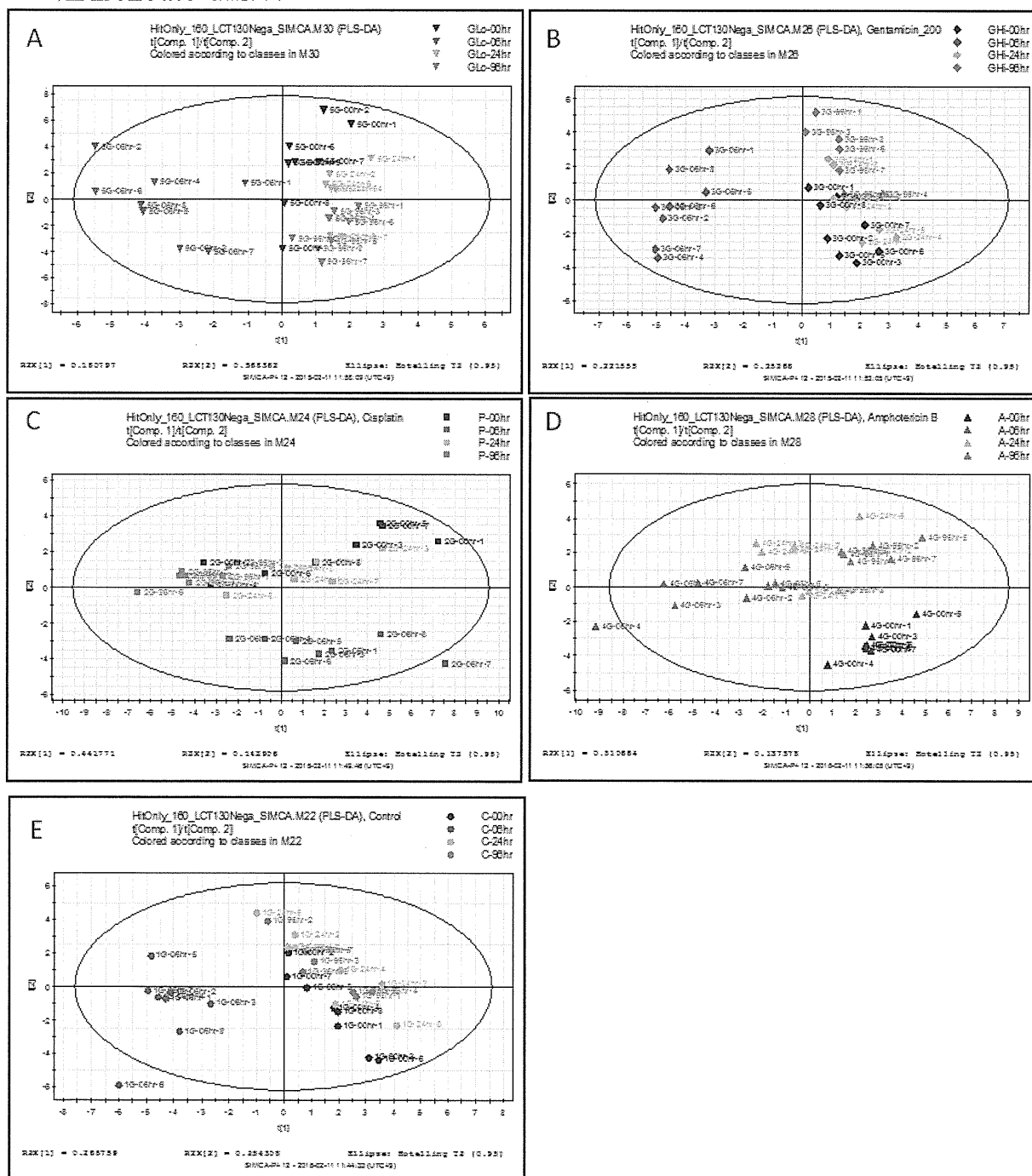


図2. 全薬剤による腎障害ラット血清中の脂質変動に関するクラスター解析  
 C, 対照群, GLo, ゲンタマイシン低用量, GHi, ゲンタマイシン高用量,  
 P, シスプラチン, A, アムホテリジンB

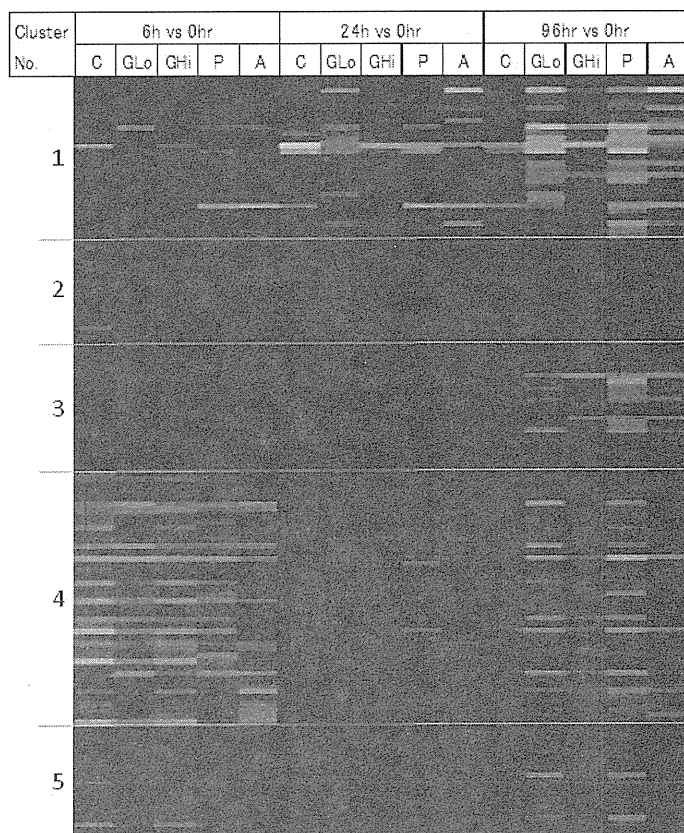
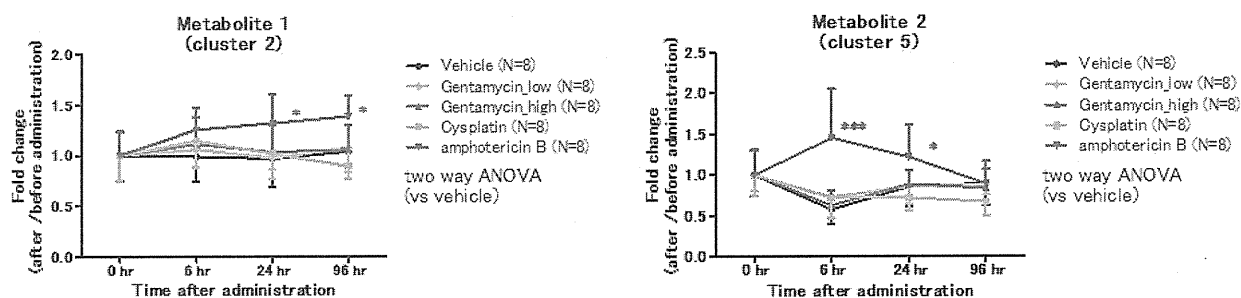


図3. 各薬剤投与による脂質分子種レベルの変動  
 (クラスター2及び5に属する分子種1及び2)



担当研究課題 肝障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

担当責任者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部部長

要旨. 医薬品開発における臨床試験や市販後において、予期せぬ肝障害の事例は多く、医薬品の安全性確保のためにその発症を回避することが望ましい。薬物性肝障害の診断バイオマーカーとしてALT、ASTが用いられているが、現在のところ临床上注意すべき薬物性肝障害を早期に診断することは困難であり、新規バイオマーカーの開発が期待されている。その一法として代謝物を網羅的に測定しうるメタボロミクス解析が、その探索に用いられつつあるが、その利用は緒に就いたばかりであり、公的評価法の確立が求められている。そこで本研究ではメタボロミクス解析、特に脂質を網羅的に測定するリポドミクス解析を用いた薬物性肝障害のバイオマーカー探索をモデルに、その評価要件・評価スキームの新規確立のためのデータを取得する。本年度はタモキシフェンによる薬物性脂肪肝をモデルとして、バイオマーカー探索を行っている。

#### 研究協力者

小林章男 日本たばこ産業株式会社 医薬総合  
研究所安全性研究所 研究企画室長

合田圭佑 日本たばこ産業株式会社 医薬総合  
研究所安全性研究所 研究員

前川京子 国立医薬品食品衛生研究所 室長

齋藤公亮 同上 主任研究官

#### A. 目的

医薬品開発における臨床試験や市販後において、予期せぬ副作用発現は、臨床試験の中止や市場からの撤退の原因として以前より問題視されている。なかでも、医薬品は肝臓に高い濃度で分布するため、このような副作用発現に関して、心臓障害と並び肝障害の事例が多い。医薬品による肝障害の発症メカニズムについては、主にアセトアミノフェンに代表される細

胞障害型、クロルプロマジンに代表される特異体質型、またこれらの複合型が知られている。一方、一部の医薬品は肝障害を起こさずに脂肪肝を引き起こす。脂肪肝自体は肝機能そのものに大きな影響を与えることはないが、肝線維化、さらには肝がんへと移行する危険性のある非アルコール性肝障害の一因とされており、臨床現場において運動療法や投薬による脂肪肝の治療が推奨されている。したがって、医薬品による脂肪肝も、重篤化が懸念される薬物性肝障害の一種であることから医薬品の安全性確保のために回避することが望ましい。

薬物性肝障害の診断には、肝臓の生体組織診断が確実とされているが、侵襲性が高いことから、特にヒトにおいては初期スクリーニングに用いることは難しい。そこで、薬物性肝障害を反映しうるバイオマーカーとして、低侵襲的に



採取でき、臨床現場に多用される血液中の ALT、AST が用いられることが多い。しかしながら、ALT、AST は必ずしも肝障害のみで上昇せず、筋肉などの他臓器の障害によって血液中レベルが増加することが知られている。また、ヘパリンナトリウム等の投与によって、一過性の ALT、AST 上昇が認められるが、肝臓の適応によりレベルが低下することも知られている。したがって、ALT、AST のみで、投与継続による肝障害の重篤化を判断することはできず、臨床で注意すべき薬物性肝障害を適切に診断することは困難である。

最近、血液中のマイクロ RNA や代謝物が、疾患、毒性のバイオマーカーとなりうることが明らかにされつつあり、薬物性肝障害についても研究が進められている。その手法に関しては、マイクロ RNA を網羅的に測定するマイクロアレイや、代謝物を網羅的に測定するメタボロミクス解析等が汎用されている。これまでにメタボロミクス解析を用いた例としては、動物を対象にした解析で、アセトアミノフェンによる肝障害でオプタルミン酸やリゾフォスファチジルコリンがバイオマーカー候補として報告されている。また、アシルカルニチンや $\gamma$ -グルタミルジペプチドがヒト薬物性肝障害患者で上昇することも報告されている。

しかしながら、mRNA の測定に汎用されてきたマイクロアレイとは異なり、メタボロミクス解析によるバイオマーカー探索はまだ緒に就いたばかりである。また、その適格性（確立）に関する評価要件のガイドラインは、1 例の概要案を除き世界的に存在せず、その推進のために公的評価法の確立が求められている。

そこで本研究ではメタボロミクス解析、特に脂質を網羅的に測定するリポドミクス解析を用いた薬物性肝障害のバイオマーカー探索を

モデルとして、その評価要件・評価スキームの新規確立のためのデータを取得することを目的としている。

## B. 研究方法

### 1) ラットへの被験物質投与

Sprague-Dawley ラットは日本チャールズ・リバーより、5 週齢時に購入し、馴化後、6 週齢から実験に用いた。ラットは 10 匹ずつ計 6 群に分け、3 群ずつタモキシフェン (10mg/kg, Sigma-Aldrich) 及びコントロール溶媒 (日局メチルセルロース, 信越化学工業) を経口投与した。タモキシフェン投与群及びコントロール群は、1 群ずつ投与 8 日目、15 日目、29 日目に前日から一晩絶食した後、採血した (図 1)。採血は EDTA-2K チューブを用いて行い、低速遠心分離によって血漿を調製し -80 度で保存した。また、採血後に肝臓を摘出し、一部は病理組織学的検査のためホルマリン溶液で固定した。

### 2) 抽出とリポドミクス解析

血漿 (100  $\mu$ L) から、内部標準物質 (IS) 存在下、メタノールによって脂質を抽出する。グリセロリン脂質 (Glycerophospholipids, GPLs) ・スフィンゴ脂質 (Sphingolipids, SPs) ・中性脂質等は、メタノール抽出液をフィルターを過し、高速液体クロマトグラフ (UltiMate 3000, ThermoFisher Scientific) 及びベンチトップ型 Orbitrap フーリエ変換質量分析計 (Q Exactive, ThermoFisher Scientific) を用いて、網羅的に測定する。並行して、酸化脂肪酸 (oxidative fatty acids, oxFA) は、さらに固相抽出を行い、サンプルとする。超高速液体クロマトグラフ (Acquity UPLC, Waters) - 三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計 (QTrap 5500, AB

SCIEX) を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定する。

#### <倫理面への配慮>

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(1973年10月1日 法律第105号、2013年改正)に従って実施される研究であり、関係機関の動物実験委員会により承認されている。

#### C. 結果と考察

2月19日に動物実験が終了し、遅滞なくメタボロミクス測定のための抽出及び測定を行う予定である。まず、血漿を対象に、タモキシフェンによる脂肪肝の早期診断、重篤化診断に用いるバイオマーカー候補代謝物を同定する予定である。

これまでの報告では、薬物性肝障害に関するバイオマーカーについていくつか報告されているものの、薬物性脂肪肝のバイオマーカーについてはあまり知られていない。また、最近我々は、脂肪肝と同様に脂質代謝異常が原因とされる薬物性リン脂質症に関して、ラットモデルと脂質を網羅的に測定するリポドミクス解析を用いることで、グルコシルセラミドとリゾフォスファチジルコリンがバイオマーカー候補となることを報告した。したがって、リポドミクス手法を用いて脂質代謝異常が関連する薬物性脂肪肝に対する新規バイオマーカーを探索することは、新規バイオマーカーの同定を介して、我が国発の公的評価法の確立に貢献できると考えられる。

そこで本年度は、脂質蓄積型肝障害(脂肪肝)を引き起こすタモキシフェンを経口連続投与し、薬物性脂肪肝に対するバイオマーカー探索を行っている。またその際に、経時的に血液及

び臓器を採取し、リポドミクス解析を行うことで、早期に薬物性脂肪肝を診断しうるバイオマーカーを探索する予定である。

次年度以降は、肝臓等のメタボローム解析を行うと共に、同定する血漿バイオマーカーについて施設間バリデーション等も遂行する予定である。本研究の遂行で得られるデータにより、メタボロミクス解析によるバイオマーカー探索に対する評価要件案及び評価スキームが作成でき、我が国発の公的評価法の確立に貢献することが期待できる。

#### D. 結論

メタボロミクス解析、特に脂質を網羅的に測定するリポドミクス解析を用いた薬物性肝障害のバイオマーカー探索をモデルに、その評価要件・評価スキームの新規確立のためのデータを取得する。本年度はタモキシフェンによる薬物性脂肪肝をモデルとして、バイオマーカー探索を行っている。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表等

論文発表等

- 1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y.: Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci*, 2014; 141: 377-386.
- 2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y,

Maekawa K, Saito Y. : Effects of Sex, Age, and Fasting Conditions on Plasma Lipidomic Profiles of Fasted Sprague-Dawley Rats. PLoS ONE, 2014; 9: e112266.

学会発表等

- 1) Maekawa K, Saito K, Pappan K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Murayama M, Kumagai Y, Saito Y. : Impact of gender, age, fed/fasted state of rats on their serum hydrophilic metabolites. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).
- 2) Saito K, Urata M, Toyoshima K, Ishikawa M, Murayama M, Tajima Y, Senoo Y, Takemoto K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. : Comparison of Plasma Lipidomic Profile of Humans with Preclinical

Animals. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).

- 3) Saito Y, Saito K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Inoue M, Kumagai Y, Pappan K, Maekawa K. : Metabolomic profiles in rat blood vary between genders, ages and fasting conditions, and their qualitative comparisons with human samples. 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition (2014. 11 San Diego, CA, USA).

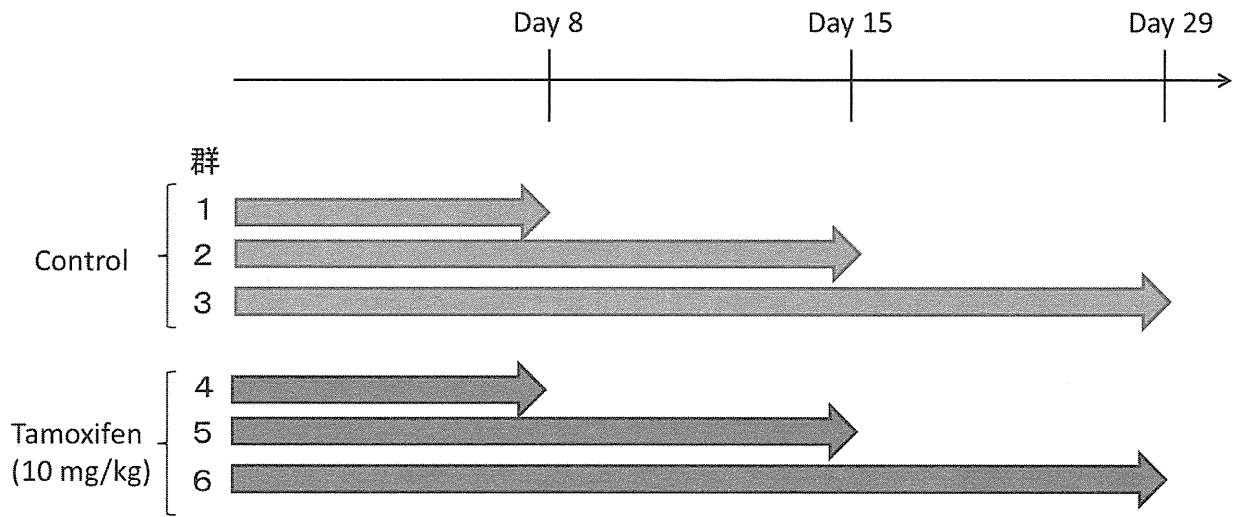
報道発表等

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. 投与計画



厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 薬物性腎障害モデル動物の作製と表現型解析

担当責任者 小松 弘幸 株式会社シミックバイオリサーチセンター研究本部 本部長

研究要旨 腎障害モデルの表現型を解析するため、既知の腎毒性物質を用いて尿中の各種バイオマーカーの変動について検討を行った。対照群には生理食塩液 4 回連続皮下投与、シスプラチンは 4 mg/kg1 回尾静脈内投与、ゲンタマイシンは高用量として 200 mg/kg あるいは低用量として 50 mg/kg を 1 日 1 回 4 日連続皮下投与、アムホテリシン B は 50 mg/kg を 1 回腹腔内投与した。

シスプラチン群では病理組織学検査で尿細管に高度な器質的变化がみられ、尿細管障害マーカーである Kim-1、尿細管再吸収のマーカーである総タンパク (TP) 及びグルコース (Glu) の増加がみられた。

ゲンタマイシン低用量群では尿細管に軽度な器質的变化がみられ、NAG、TP 及び Glu がそれぞれ増加した。

ゲンタマイシン高用量群では尿細管に中等度な器質的变化がみられ、NAG、Kim-1、TP 及び Glu がそれぞれ増加した。

アムホテリシン B 群では尿細管に軽微な器質的变化がみられ、Kim-1、NAG、TP の増加がみられた。Glu の増加は 0-6 時間のみで一過性であった。

以上の結果は腎障害の部位、程度、時期によって反応するバイオマーカーが異なることを示しており、腎障害を尿中サンプルより検出するためにはバイオマーカーの選択に注意を要すると思われた。

研究協力者

株式会社シミックバイオリサーチセンター

研究本部 鈴木慶幸

株式会社シミックバイオリサーチセンター

研究本部 スペシャリスト 橘田久美子

株式会社シミックバイオリサーチセンター

研究本部 スペシャリスト 江田 景

株式会社シミックバイオリサーチセンター

研究本部 高尾 みゆき

株式会社シミックバイオリサーチセンター

研究本部 スペシャリスト 正木 文夫

A. 研究目的

腎障害バイオマーカーは血清クレアチニン (sCre) や血中尿素窒素 (BUN) が使用されてきたが、感度の面で不十分であった。近年、アメリカの安全性予測試験コンソーシアム (Predictive Safety Testing Consortium: PSTC) が非臨床試験でのラットの急性腎障害 (AKI) を検出するための指標として、7 種類の尿中バイオマーカー (Kim-1、Clusterin、Albumin、TFF3、

Cystatin C、b2-microglobulin、Total protein) を報告した。この内、Kim-1、クラスτεリン、アルブミン及び TFF3 は尿細管障害マーカー、シスタチン C、b2-ミクログロブリン及び総タンパクは糸球体障害マーカーとして知られている。

これら以外にも、肝臓型脂肪酸結合タンパク (L-FABP) も尿中腎バイオマーカーの候補として検討が進められている。L-FABP は AKI の診断薬として保険適用がされている。非臨床分野での有用性は現在検討が進められている<sup>1), 2)</sup>。

NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin、Lipocalin-2) も糸球体からろ過され尿細管で再吸収を受けるが、尿細管が障害を受けたときは吸収されず尿中に出現するため、尿細管障害マーカーとして使用されている。

このように各種バイオマーカーの有用性は報告されてきているものの、腎毒性物質と尿中バイオマーカーを含めたその表現型の関係はまだ整理されていない。

そこで今回、我々は腎障害モデルの病態表現既知の腎毒性物質の関係を明らかにするため、腎毒性物質投与後の各種尿中バイオマーカーの変動について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

シスプラチン (ブリプラチン注 10 mg/20 mL、ブリストルマイヤーズスクイブ株式会社) はそのまま投与に用いた。ゲンタマイシン

(Sigma-Aldrich) は、日本薬局方生理食塩液 (扶桑薬品工業株式会社、以下生理食塩液) で 100 mg/mL (高用量) あるいは 25 mg/mL (低用量) になるように溶解して使用した。アムホテリシン B (和光純薬工業) は DMSO で 40 mg/mL (stock solution) になるように溶解した。その後 5 mg/mL になるように生理食塩液 (扶桑薬品工業

株式会社) で溶解して使用した。

### 2) 動物

SD 系雄ラット (日本チャールスリバー) は 5 週齢で入荷し、検疫・馴化飼育の後、6 週齢で実験に使用した。

### 3) 群構成

対照群には生理食塩液を 1 mL/kg の割合で 4 回皮下投与した。シスプラチンは 0.5 mg/mL 液を 8 mL/kg (投与量として 4 mg/kg) の割合で 1 回尾静脈内投与した。ゲンタマイシンは 100 mg/mL 液 (高用量、1 回の投与量として 200 mg/kg) あるいは 25 mg/mL 液 (低用量、1 回の投与量として 50 mg/kg) を 2 mL/kg の割合で 1 日 1 回 4 日連続皮下投与した。アムホテリシン B は 5 mg/mL 液を 10 mL/kg の割合 (投与量として 50 mg/kg) で 1 回腹腔内投与した。動物数は各群 8 例ずつとした。投与量はラットで腎障害を引き起こす量を選択した。投与日を投与第 1 日とした。

### 4) 採血及び採尿スケジュール

採血は初回投与の投与前、投与後 6 時間、24 時間、96 時間に頸静脈より無麻酔下で採血した。血液は 1 時間室温放置後、4°C、3000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた血清はサンプルチューブに分注後、測定まで -80°C、で凍結保存した。

採尿は採尿ケージを用いて投与前 (投与 24 時間前から投与前までの蓄積尿)、投与後 6 時間 (投与から 6 時間までの蓄積尿)、24 時間 (投与 6 時間から 24 時間までの蓄積尿)、96 時間 (投与 72 時間から 96 時間までの蓄積尿) に採取した。尿量測定後、測定まで -80°C で保存した。

### 5) 剖検

初回投与の5日後剖検を行った。剖検24時間前から絶食させ、翌日、イソフルラン麻酔下で腹大動脈から放血安楽死させて剖検した。

#### 6) 血液生化学検査

血清中尿素窒素 (BUN、ウレアーゼ・LEDH法) 及びクレアチニン (酵素法) は自動分析装置 (JCA-BM6010、日本電子株式会社) を用いて測定した。

#### 7) 尿検査

尿中の N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ (NAG、酵素法)、グルコース (Glu, GlcK・G-6-PDH法)、総タンパク (TP、ピロガロールレッド法) 及びクレアチニン (酵素法) は自動分析装置 (JCA-BM6010、日本電子株式会社) を用いて測定した。尿量も測定した。尿中 Kim-1 (kidney injury molecule) はサンドイッチ法 ELISA で測定した。Kim-1、NAG、TP 及び Glu 濃度は尿中クレアチニン濃度で補正した。

#### 8) 病理検査

腎臓は重量測定後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、包埋、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色を施して鏡検した。剖検日の体重を元に腎臓の相対重量も算出した。

#### 9) 統計処理

Bartlett 検定 (有意水準 5%) で有意差が認められない場合は Dunnett 検定 (有意水準両側 5%)、有意差が認められた場合は Steel 検定 (有意水準両側 5%) で対照群と薬剤群を比較した。

#### <倫理面への配慮>

本試験は試験施設の IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee、動物実験委員会) によって承認を受けた (承認番号: 2014-130)。

なお、当試験施設は AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International、国際実験動物管理評価認定協会) の認証を取得した施設である (認証番号: 001182)。

### C. 研究結果

#### C.1. 体重 (Fig.1)

投与第3日から4日にかけて対照群と比較してシスプラチン群で体重増加抑制がみられた。

#### C.2. 血液生化学検査 (Fig 3a, 3b)

投与6時間で対照群の BUN と比較してシスプラチン群で減少、ゲンタマイシン高用量群で増加がみられた。投与24時間で対照群の BUN と比較してシスプラチン群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与96時間で対照群の BUN と比較してシスプラチン群ゲンタマイシン高用量群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与第4日で対照群の血清クレアチニンと比較してシスプラチン群で増加がみられた。

#### C.3. 尿検査 (Fig 4a~4f)

投与6時間で対照群の尿量と比較してアムホテリシン B 群で増加がみられた。

尿中クレアチニンは72-96時間でゲンタマイシン低用量、高用量群及びアンホテリシン B 群で減少がみられた。

投与0-6時間で対照群の NAG と比較してゲンタマイシンの低及び高用量群、アムホテリシン B 群で増加がみられた。投与6-24時間で対照群の NAG と比較してアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与72-96時間で対照群の NAG と比較してゲンタマイシンの低及び高用量群、アムホテリシン B 群で増加がみられた。

投与 0-6 時間で対照群の Kim-1 と比較してゲンタイマイシン高用量群で増加がみられた。投与 6-24 時間で対照群の Kim-1 と比較してシスプラチン群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与 72-96 時間で対照群の Kim-1 と比較してシスプラチン、ゲンタイマイシン高用量群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。

投与 0-6 時間で対照群の TP と比較してシスプラチン群、ゲンタイマイシンの低及び高用量群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与 6-24 時間で対照群の TP と比較してアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与 72-96 時間で対照群の TP と比較してシスプラチン群、ゲンタイマイシンの低及び高用量群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。

投与 0-6 時間で対照群の Glu と比較してゲンタイマイシン高用量群及びアムホテリシン B 群で増加がみられた。投与 6-24 時間で対照群の Glu と比較してゲンタイマイシンの低及び高用量群で増加がみられた。投与 72-96 時間で対照群の Glu と比較してシスプラチン群、ゲンタイマイシンの低及び高用量群で増加がみられた。

#### C.4. 病理検査 (Fig 2, Table1)

腎臓重量は対照群と比較してゲンタイマイシン高用量群で左右ともに増加がみられた。病理組織学的検査では対照群の 1 例に軽微な腎皮質尿細管上皮細胞の好塩基性変化がみられた。

シスプラチン群では軽度から高度の腎髄質外層の尿細管上皮細胞の変性/壊死が 8 例全例に、軽微な尿硝子円柱が 7 例に認められた。

ゲンタイマイシン低用量群では 7 例に軽微～軽度の腎皮質尿細管上皮細胞の好塩基性変化、2 例に軽微な間質の単核細胞浸潤がみられた。

ゲンタイマイシン高用量群では 8 例全例に軽微

～軽度の腎皮質尿細管上皮細胞の好塩基性変化、5 例に軽微な間質への単核細胞浸潤、5 例に軽微な尿細管上皮細胞の壊死がみられた。

アムホテリシン B 群では 7 例に軽微な腎皮質尿細管上皮細胞の好塩基性変化がみられた。

#### D. 考察

シスプラチンは病理組織学検査で腎髄質外層の尿細管上皮細胞の変性/壊死及び軽微な尿硝子円柱がほぼ全例にみられた。高度な器質的变化がみられ、以下のバイオマーカーにも変化がみられた。

尿細管障害マーカーである Kim-1 は投与後 6-24 時間で上昇がみられ 96 時間まで大きな増加がみられた。一方、NAG に変化はみられなかった。尿細管再吸収のマーカーである TP 及び Glu は 72-96 時間尿で大きく増加した。

ゲンタイマイシン低用量群では 7 例に軽微～軽度の腎皮質尿細管上皮細胞の好塩基性変化、2 例に軽微な間質の単核細胞浸潤がみられた。器質的变化は軽度であったが、以下の変化がみられた。

シスプラチンとは異なり NAG は投与後 0-6 及び 72-96 時間で増加がみられたが、投与 4 日まで Kim-1 の明らかな変化はみられなかった。

TP 及び Glu は 0-6 及び 72-96 時間、6-24 及び 72-96 時間でそれぞれ増加した。

高用量群では 8 例全例に軽微～軽度の腎皮質尿細管上皮細胞の好塩基性変化、5 例に軽微な間質への単核細胞浸潤、5 例に軽微な尿細管上皮細胞の壊死がみられた。器質的变化は中等度で、以下の変化がみられた。

NAG 及び Kim-1 は投与後 0-6 及び 72-96 時間で増加がみられた。TP 及び Glu は 0-6 時間から 72-96 時間までそれぞれ増加した。

アムホテリシン B 群では 7 例に軽微な腎皮質



尿細管上皮細胞の好塩基性変化がみられた。器質的障害は軽微で、以下のような変化がみられた。

Kim-1 は投与後 6-24 及び 72-96 時間、NAG は 0-6~72-96 時間でそれぞれ増加がみられた。TP は 0-6~72-96 時間まで、Glu は 0-6 時間のみでそれぞれ増加した。

以上の結果は腎障害の部位、程度、時期によって反応するバイオマーカーが異なることを示しており、腎障害を尿中サンプルより検出するためにはバイオマーカーの選択に注意を要すると思われた。

今後、尿サンプルを用いた腎障害の検出には腎傷害の程度と他のバイオマーカーとの関係を詳細に検討していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

既知の腎毒性物質を投与して腎傷害の表現型解析を行った結果、傷害部位及びその程度、時期により変動する尿中バイオマーカーが異なることが示された。尿中バイオマーカーを用いて腎臓の機能及び器質的障害を検出するためには複数のバイオマーカーを用いて総合的に判断することが重要であると考えられた。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

#### G. 研究発表等

論文発表等

該当なし。

学会発表等

01. 鈴木 慶幸, 小松 弘幸, 門田 利人, 及川 剛, 田口 景子, 筑広 紗弥香, 菅谷 健, 齋藤 明美 : SD ラットのゲンタマイシン腎障害における尿中 L-FABP と他の尿中腎障害バイオマーカーの比較. 第 41 回日本毒性学会学術年会(神戸, 2014.7.)
02. T. Kadota, Y. Suzuki, H. Komatsu, K. Taguchi, T. Sugaya. Evaluation of Urinary L-FABP As a Nephrotoxicity Biomarker in Rats. 53th annual meeting, Society of Toxicology (Phoenix, USA, March, 2015)

報道発表等

該当なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

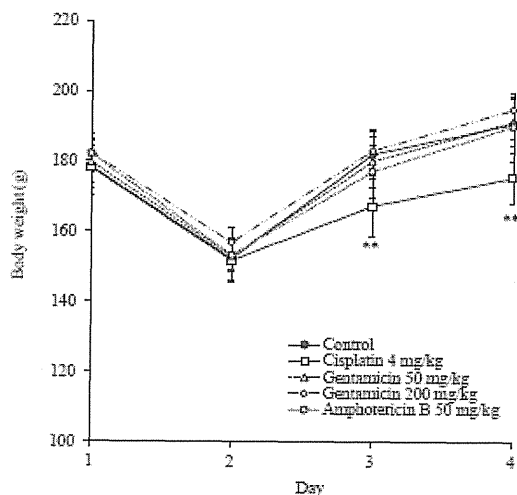


Fig. 1 体重  
5例の平均値と標準偏差を示す。  
\*\*  $p < 0.01$ : Control群に対して有意差あり (Dunnett's test).

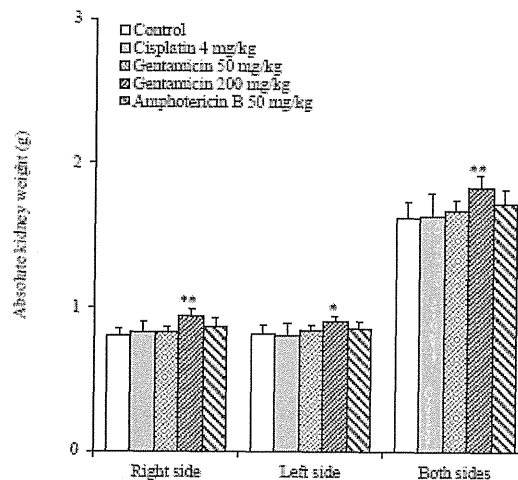


Fig. 2 腎臓重量  
5例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Control群に対して有意差あり (Dunnett's test)

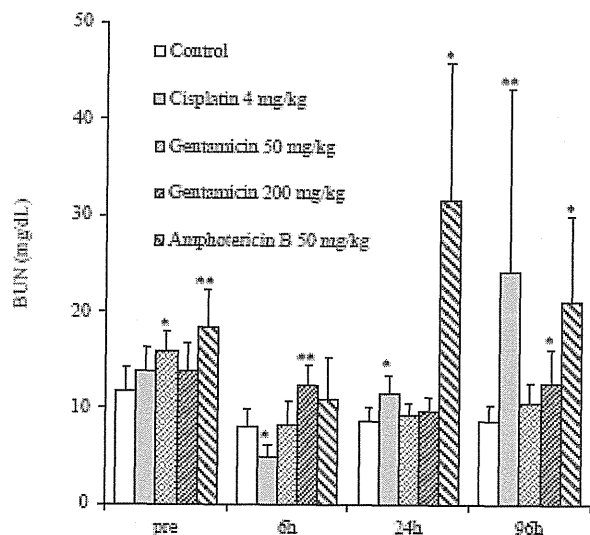


Fig. 3a 血液生化学的検査 - BUN  
5例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Control群に対して有意差あり (Dunnett's/Steel's test)

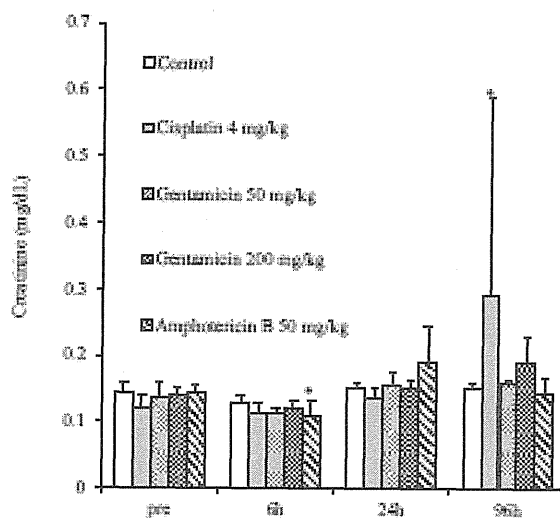


Fig. 3b 血液生化学的検査 - クレアチニン  
5例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ : Control群に対して有意差あり (Dunnett's/Steel's test).

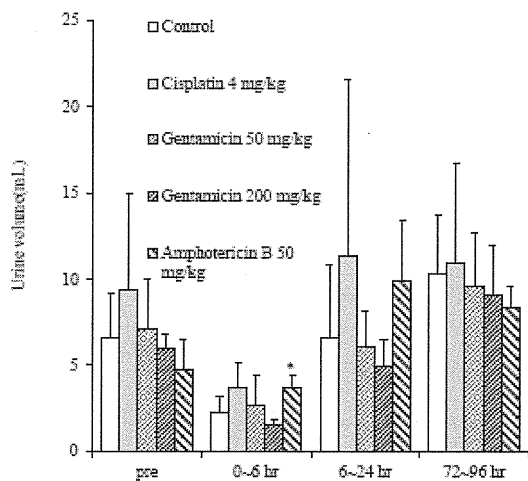


Fig. 4a 尿検査 - 尿量  
8例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ ; Control群に対して有意差あり (Steel's test).

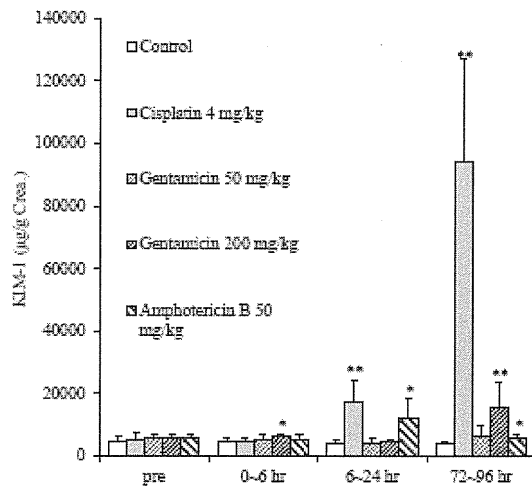


Fig. 4d 尿検査 - KIM-1 (クレアチニン補正)  
8例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; Control群に対して有意差あり (Dunnnett's/Steel's test).

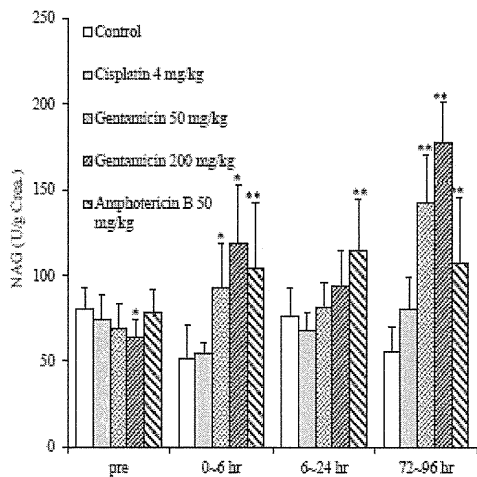


Fig. 4c 尿検査 - NAG (クレアチニン補正)  
8例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; Control群に対して有意差あり (Dunnnett's/Steel's test).

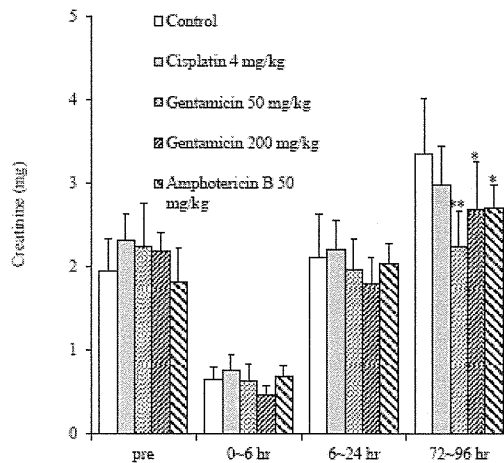


Fig. 4b 尿検査 - クレアチニン (尿量補正)  
8例の平均値と標準偏差を示す。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; Control群に対して有意差あり (Dunnnett's test).

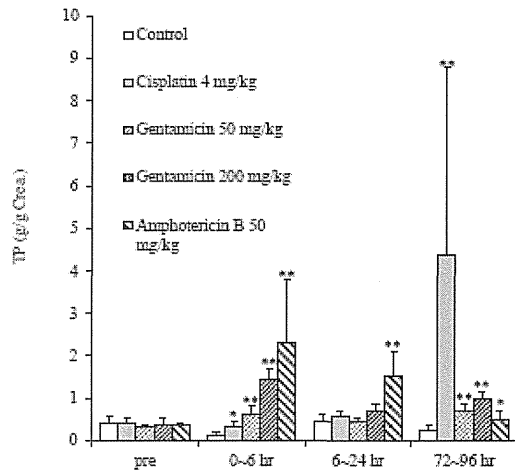


Fig. 4e 尿検査 - TP (クレアチニン補正)  
8例の平均値と標準偏差を示す。  
\* p<0.05, \*\* p<0.01: Control群に対して有意差あり (Steel's test).

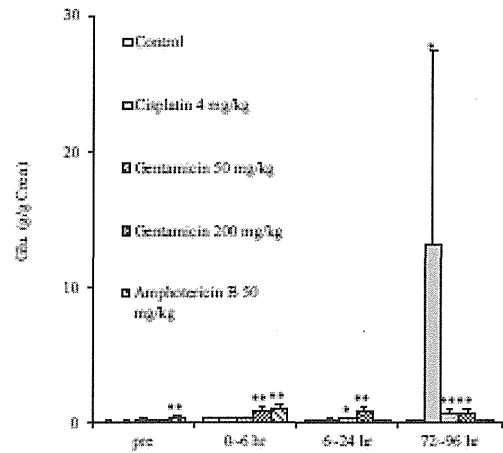


Fig. 4f 尿検査 - Gln (クレアチニン補正)  
8例の平均値と標準偏差を示す。  
\* p<0.05, \*\* p<0.01: Control群に対して有意差あり (Dunn-Sidak's test).

Table 1. Histopathological Findings

Group	Control	Cisplatin	Gentamicin	Gentamicin	Amphotericin B
Dose (mg/kg)	0	4	200	50	50
Administration route and times	sc, 4 times	iv, once	sc, 4 times	sc, 4 times	ip, once
Animal No.	1101~1108	1201~1208	1301~1308	1401~1408	1501~1508
	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8
<b>Kidney</b>					
<b>Cortex</b>					
Basophilic change, epithelium, tubules	1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	2 2 2 1 2 2 1 1	1 1 1 2 1 0 1 1	1 1 1 1 1 0 1 1
Cell infiltration, mononuclear cells, interstitium	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0
Necrosis, epithelium, tubules	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0
<b>Outer medulla</b>					
Degeneration/necrosis, epithelium, tubules	0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 3 4 2 4 4 4	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0
Urinary casts, hyalin	0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 0 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0
Grade: 0: No change, 1: Very slight, 2: Slight, 3: Moderate, 4: Marked.					