厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

# 国内外で開発されOECDで公定化されるNAMを活用した試験法の行政的な受け入れに対応するための研究

令和６年度分担研究報告書

## *In vitro* 腎毒性評価の TG 開発及び実験データ支援

研究分担者　松下　幸平

国立医薬品食品衛生研究所　安全性生物試験研究センター　病理部　室長

**研究要旨**

腎臓の尿細管上皮細胞はその生理学的な特徴から化学物質による毒性影響を受けやすい細胞である。本研究では腎毒性の AOP 作製に資する情報を得ることを目的とし、尿細管上皮細胞を直接的に障害することが知られるコリスチンの毒性メカニズムについて検討した。

6 週齢の雄性 SD ラットに 0、15 及び 30 mg/kg のコリスチンを 28 日間反復皮下投与し、腎臓について各種解析を実施した。

病理解析において 15 及び 30 mg/kg 群ともに近位尿細管上皮の空胞化及び単細胞壊死がみられた。空胞化した尿細管は再生マーカーである Kim-1 に陽性を示し、単細胞壊死の一部はアポトーシスマーカーである c-caspase 3 に陽性を示した。30 mg/kg 群の空胞化/再生尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取してマイクロアレイ及びパスウェイ解析を行った結果、空胞化/再生尿細管では IL-34 等の炎症性サイトカインを含むマクロファージの活性化に関わるパスウェイの活性化が示唆された。また *in situ* hybridizaton 法において再生/空胞化尿細管における Il-34 mRNA の発現亢進が認められ、これらの尿細管周囲には CD68 陽性のマクロファージが認められた。

本研究結果から、コリスチン誘発腎毒性のメカニズムには障害を受けた尿細管によるサイトカイン産生を介した二次的な障害も関与する可能性が示唆された。本結果は腎毒性の AOP 作製に資する有用な情報となることが期待される。

### A. 研究目的

腎臓は化学物質による障害を受けやすい臓器であり、特に尿細管上皮細胞はその生理学的な特徴から腎毒性の主要な標的となる。本研究では腎毒性の AOP 作製に資する情報を得ることを目的とし、尿細管を標的とした腎毒性物質であるコリスチンの毒性メカニズムについて検討した。

### B. 研究方法

6 週齢の雄性 SD ラットを 3 群に配し（n=5）、媒体である生理食塩水もしくはコリスチンを 15 及び 30 mg/kg 体重（5 mL/kg 体重）の用量で 1 日 1 回、28 日間反復皮下投与した。体重測定を週に 1 回行い、最新体重に基づいて投与容量を算出した。最終投与 1 日後にイソフルラン深麻酔下において腹大動脈から採血した後、放血により安楽死させて剖検を行った。剖検時に腎臓を摘出して重量を測定した後、一部を 10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、残りの組織

は液体窒素にて瞬間凍結もしくは OCT コンパウンドにて凍結ブロックを作製した後、-80℃にて保存した。得られた血液サンプルを常温下で遠心（3000 rpm、15 分）して血清を分離し、尿素窒素（BUN）及びクレアチニン（sCre）の値を測定した。また、10%中性緩衝ホルマリンで固定した腎臓組織を用いて定法に従いパラフィン包埋、薄切し、HE 染色を施して病理組織学的検索を行った。さらに免疫組織学的解析のため、組織標本を抗原賦活化処置としてクエン酸バッファ（pH6.0）に浸漬してオートクレーブ処置し（121℃、15 分）、3% $H_2O_2$/メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを除去した。引き続き、非特異反応を除去するため 10%正常ヤギ血清を用いてブロッキング処置を施した後、抗 kidney injury molecule-1（Kim-1）抗体、c-caspase 3 抗体及び抗 CD68 抗体を 4℃にて一晩インキュベートし、二次抗体（ポリマー法：ヒストファインシンプルステイン）を室温下で 30 分インキュベートした。ジアミノベンジジンにて反応を可視化し、ヘマトキシリンにより核染色を行った。単位面積当たりの Kim-1 及び c-caspase 陽性細胞数並びに CD68 陽性面積について画像解析ソフト（HALO）を用いて算出した。また Kim-1 陽性尿細管及び CD68 陽性マクロファージの局在を検討するため、Kim-1 及び CD68 の二重蛍光免疫染色を行った。さらに interleukin-34（IL-34） mRNA の局在を *in situ* hybridization 法（RNAscope™）により解析した。

対照群及び 30 mg/kg 群の凍結ブロックを薄切（約 15 μm）し、on ice で迅速 HE 染色を施した。対照群の正常尿細管及び 30 mg/kg の空胞化/再生尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した。正常尿細管と比較して空胞化/再生尿細管において発現の変動していた遺伝子群を抽出し、Ingenuity® Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った。また、瞬間凍結組織から tRNA を抽出し、合成した cDNA を用いて定量 PCR 法により Kim-1 及び IL-34 の遺伝子発現を検索した。

統計学的解析として、体重、腎重量、血清生化学的検査、画像解析及び遺伝子発現解析のデータについて一元配置分散分析（ANOVA）を実施した後に Dunnett 法による多重検定を行った。有意水準は 0.05 に設定した。

（倫理面への配慮）

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

## C. 研究結果

体重測定では、15 mg/kg 群において 1、3 及び 4 週に、30 mg/kg 群においては 1 から 4 週にかけて有意な体重の低値が認められた（図 1A）。腎臓の重量測定では、15 mg/kg 群では絶対重量の有意な低値が認められ、30 mg/kg 群においては絶対重量の有意な低値及び相対重量の有意な高値がみられた（図 1B）。血清生化学的検査では、15 及び 30 mg/kg 群において BUN 及び sCre が有意な高値を示した（図 1C）。病理解析では 15 及び 30 mg/kg 群ともに近位尿細管上皮の空胞化及び単細胞壊死がみられた（図 2A）。空胞化した尿細管の一部は核密度が高く、再生尿細管のマーカーである Kim-1 に陽性を示した（図 2B）。また単細

胞壊死の一部はアポトーシスマーカーである c-caspase 3 に陽性を示した（図 2C)。マイクロアレイにおいて、正常尿細管と比較して空胞化/再生尿細管では 461 および 497 個の遺伝子の発現がそれぞれ上昇および減少していた（図 3A)。パスウェイ解析では空胞化/再生尿細管では IL-34 等の炎症性サイトカインを含むマクロファージの遊走や活性化に関わるパスウェイの活性化が認められた（図 3B)。また *in situ* hybridizaton 法において再生/空胞化尿細管における Il-34 mRNA の発現が亢進していることが示され、さらにこれらの尿細管周囲には CD68 陽性のマクロファージが多く認められた（図 4)。

**D. 考察**

コリスチンは近位尿細管を直接的に障害することが知られているものの、その腎毒性の詳細なメカニズムは不明である。本研究においてコリスチンにより障害を受けた尿細管ではマクロファージの活性化に関わる炎症性サイトカインの発現が亢進しており、それらの尿細管周囲ではマクロファージの浸潤が認められた。よって、コリスチン誘発腎毒性のメカニズムには直接的な近位尿細管への障害に加え、障害を受けた尿細管によるサイトカイン産生を介した二次的な障害も関与することが示唆された。IL-34 は腎虚血再灌流処置による腎障害モデルマウスの尿細管においても発現し、腎障害を増悪させることが報告されている。よって、障害を受けた尿細管による IL-34 産生を介した二次的な障害は、一次的な障害の原因やメカニズムに関わらず腎障害に共通した現象である可能性が考えられた。

**E. 結論**

コリスチンの腎毒性メカニズムには一次的に障害を受けた尿細管から産生される炎症性サイトカインによる二次的な障害が関与していることが示唆された。本結果は腎毒性の AOP 作製に資する有用な情報となることが期待され、引き続き実験データを蓄積する。

**F. 研究発表**

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

1. 松下幸平、豊田武士、赤木純一、水田保子、小川久美子. コリスチン誘発腎毒性のメカニズム解明. 第 41 回日本毒性病理学会（2025.1.31）

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

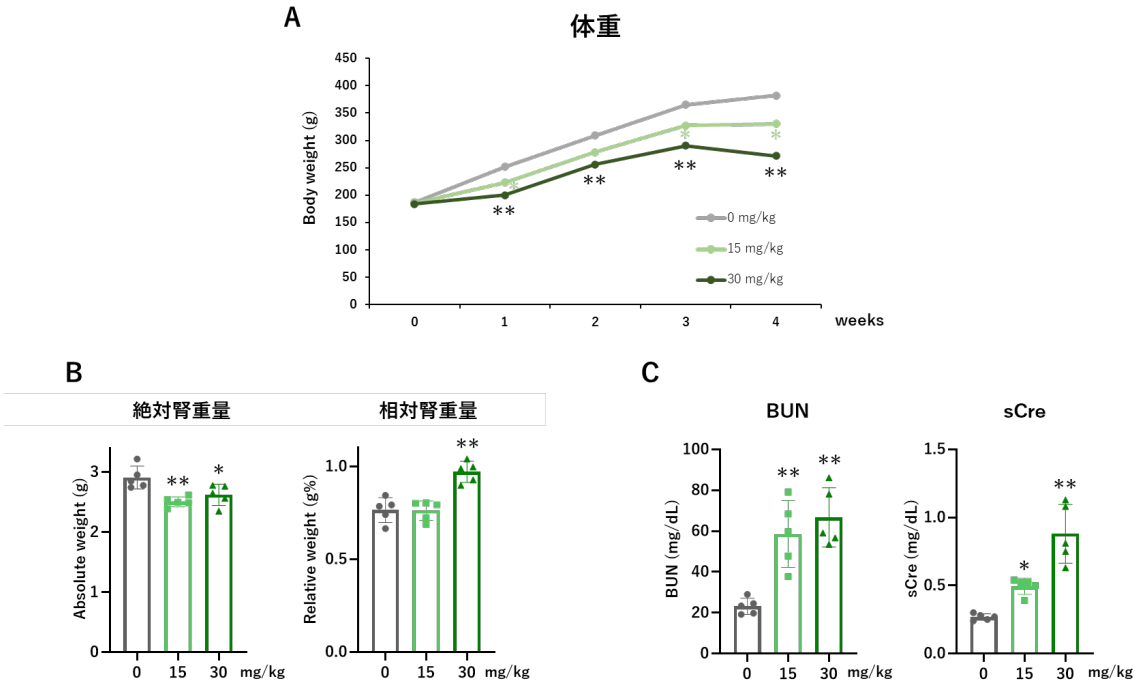


**図1.** (A) 体重の推移、(B) 腎重量、(C) 血清生化学的検査。*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 mg/kg, respectively.

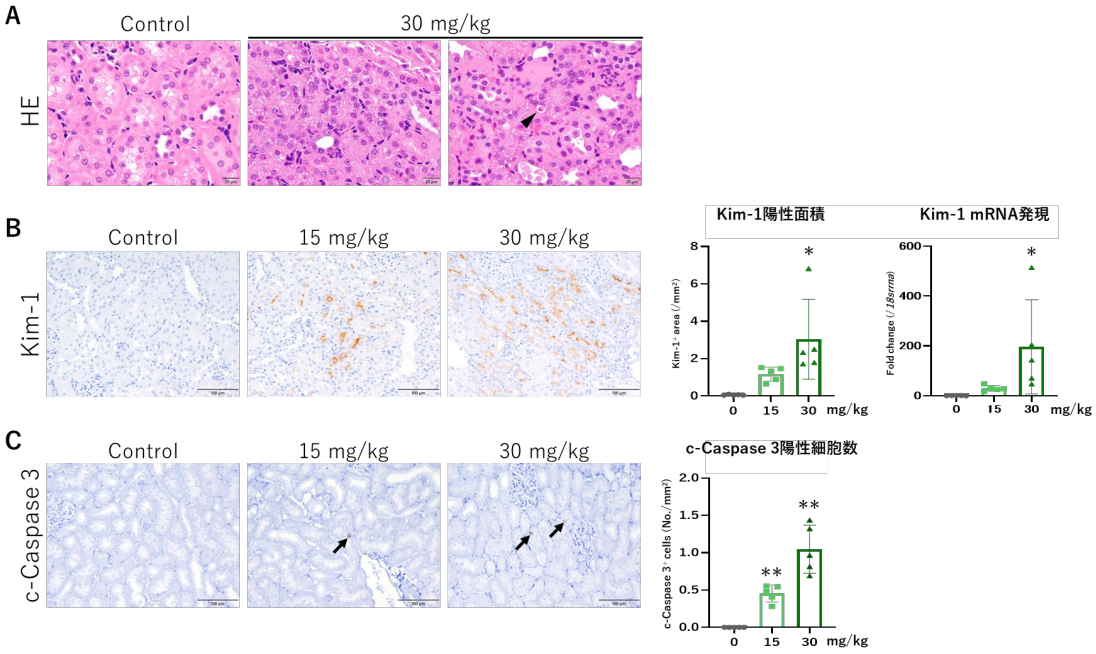


**図2.** (A) HE染色、(B) 免疫染色及び定量PCR法によるKim-1発現解析、(C) 免疫染色によるc-Caspase 3陽性細胞の検出。*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 mg/kg, respectively. 矢頭：単細胞壊死。矢印：c-Caspase 3陽性細胞。

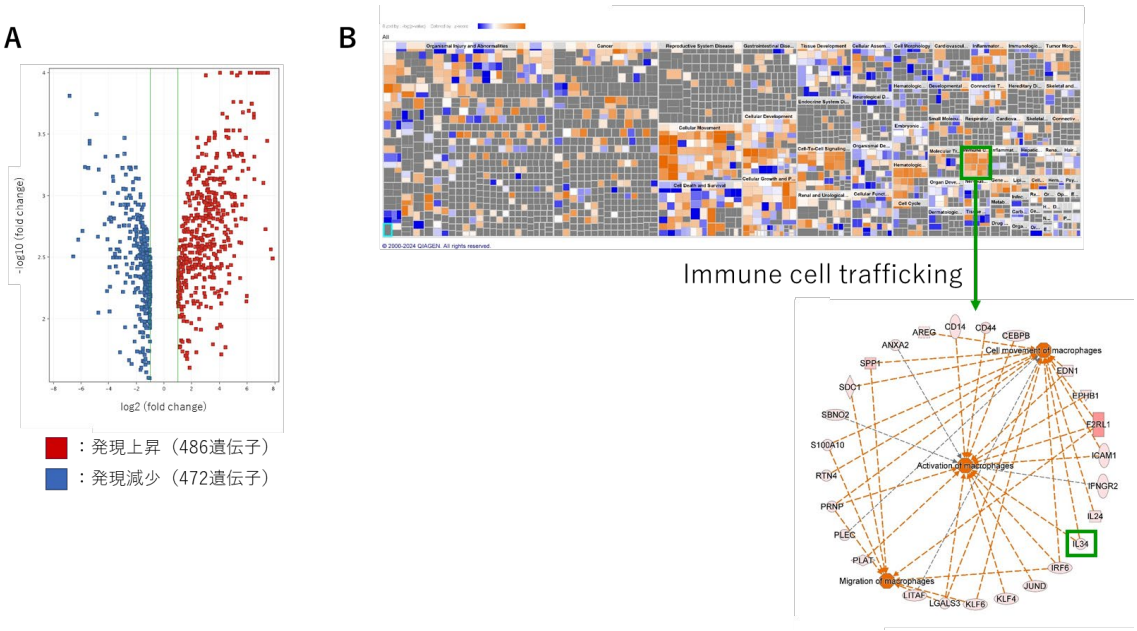


**図 3.** （A）マイクロアレイにおける Volcano plot、（B）パスウェイ解析。

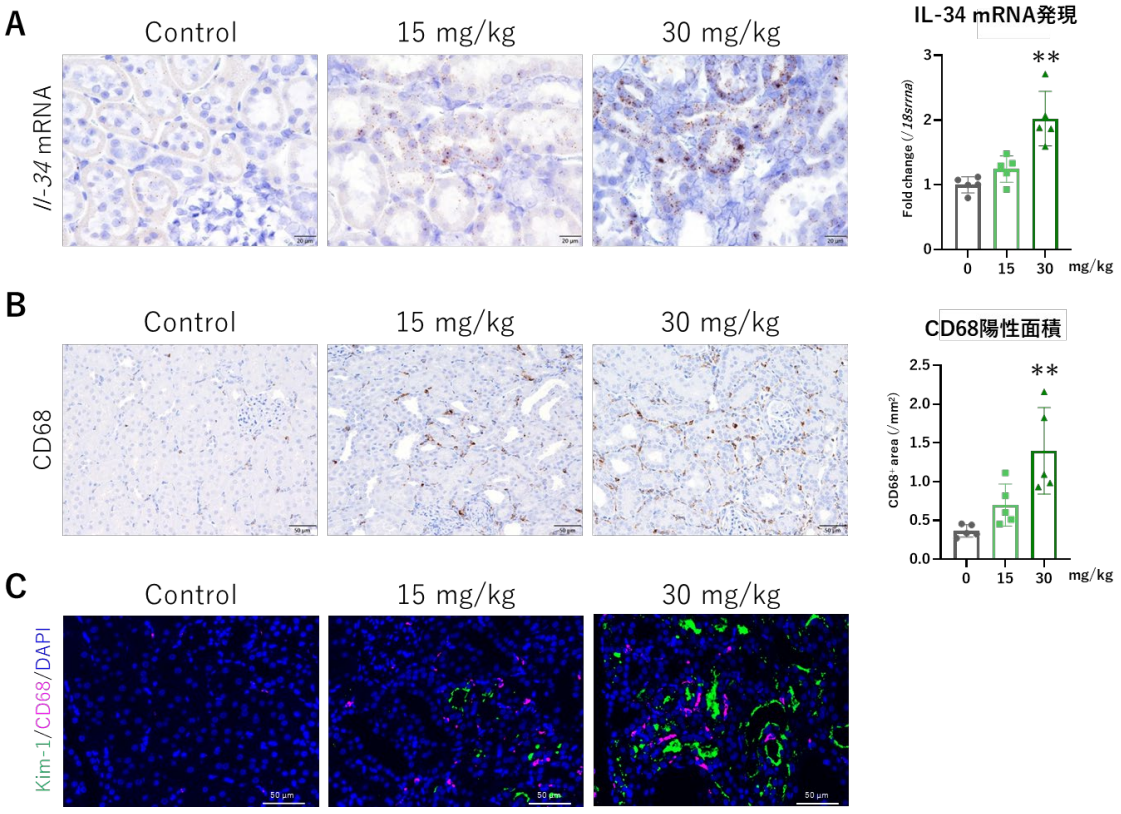


**図 4.** （A）*in situ* hybridization 法および定量 PCR 法による IL-34 発現解析、（B）CD68 発現解析、（C）Kim-1 陽性尿細管及び CD68 陽性マクロファージの局在解析。**: $p < 0.01$ vs. 0 mg/kg.