

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7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 第三室長

研究要旨

腎障害が生じた後に尿細管の再生異常が生じた場合、線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。我々はこれまで尿細管の再生異常を **Key Event (KE)** とした腎障害・腎線維化の **AOP** 作製に資するデータを得ることを目的とし、種々の尿細管障害物質を用いて検討を行った。その結果、再生異常の生じた尿細管には **CD44** が発現する可能性を見出しており、**CD44** を測定可能なエンドポイントとしての有用性を検証している。本年度は糸球体障害に続発する腎線維化における検証を行うため、糸球体障害物質であるアドリアマイシンによるラット腎線維化モデルの作製条件を検討した。

6 週齢雄性 **SD** ラットにアドリアマイシンを種々の用量で単回あるいは 2 回静脈内投与し、最終投与の 4 週間後に剖検を行い腎臓について解析を行った。その結果、**6 mg/kg** の 2 回投与が最も適切なラット腎線維化モデルの作製条件と考えられた。また尿細管障害物質により作製したラット腎線維化モデルと同様に、線維化病変内の拡張あるいは萎縮した尿細管において **CD44** の発現が認められた。よって、**CD44** は尿細管障害の原因に依らず再生異常尿細管に発現するものと考えられた。

引き続き腎線維化の **AOP** における **CD44** のエンドポイントとしての有用性を検証するとともに、**KE** 設定に資する情報を得るため、アドリアマイシン誘発ラット腎線維化モデルにおける病態形成及び **CD44** 発現を経時的に観察する予定である。

A. 研究目的

腎障害が生じた後に尿細管の再生異常が生じた場合、線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。我々はこれまで尿細管の再生異常を **KE** とした腎障害・腎線維化の **AOP** 作製に資するデータを得ることを目的とし、研究を行ってきた。その一環として、尿細管を標的とする種々の腎毒性物質をラットに投与して線維化モデルを作製し、解析を行った。その結果、各モデルに共通して線維化病変内の尿細管に **CD44** が限局して発現していることを明ら

かにした。よって、腎線維化

Adverse Outcome Pathway (AOP) における **CD44** の測定可能なエンドポイントとしての可能性を見出した。

本研究では引き続き **CD44** の **AOP** におけるエンドポイントとしての汎用性を検証するため、糸球体障害物質の投与によるラット腎線維化モデルを作製し、直接的な尿細管障害を介さない線維化病態における **CD44** の発現を解析した。本年度は代表的な糸球体障害物質であるアドリアマイシンの投与条件の検討を行った。

B. 研究方法

実験①：6週齢の雄性SDラットを5群に配し（n=5）、媒体である生理食塩水もしくはアドリアマイシンを4、6、8及び10 mg/kg 体重（10 mL/kg 体重）の用量で単回静脈内投与した。投与28日後に生存例について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。

実験②：6週齢の雄性SDラットを5群に配し（n=5）、媒体である生理食塩水もしくはアドリアマイシンを2、4、6及び8 mg/kg 体重（10 mL/kg 体重）の用量で試験開始時及び試験開始2週間後の2回、静脈内投与した。2回目の投与から4週間後に実験①と同様に剖検及び解析を実施した。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% H₂O₂/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CD44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：ヒストファイニ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。

統計学的解析として、体重、血液生化学的検査及び腎重量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

実験①：体重測定の結果を図1Aに示す。実験開始3週時において、最高用量群の10 mg/kg群において一般状態の悪化及び体重減少がみられたため、全例を安楽死させた。その他の群は試験終了時まで生存した。血清生化学的検査では、全投与群において対照群と比較してBUN及びsCreの有意な変動は認められなかった（図1B）。腎重量測定では、6及び8 mg/kg群において相対重量が対照群と比較して有意な高値を示した（図1C）。病理組織学的解析の結果を図2に示す。全群で糸球体における障害性の変化が極軽度から軽度に認められた。6及び8 mg/kg群で尿細管における障害性の変化が軽度に認められたものの、明らかな線維化病変は認められなかった。

実験②：体重測定の結果を図3Aに示す。実験開始4週時において、最高用量群の8 mg/kg群において一般状態の悪化及び体重減少がみられたため、全例を安楽死させた。その他の群は試験終了時まで生存した。血清生化学的検査では、6 mg/kg群においてBUN及びsCreが対照群と比較して有意な高値を示した（図3B）。腎重量測定では、4及び6 mg/kg群において対照群と比較して相対重量の有意な高値を認めた（図3C）。病理組織学的解析の結果を図4

に示す。全群で糸球体における障害性の変化が軽度から中程度に認められた。また4及び6 mg/kg群で尿細管の障害性変化が認められ、線維化病変の形成が4 mg/kg群では軽度に、6 mg/kg群で中程度に認められた。また4及び6 mg/kg群の線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、免疫染色にてCD44に陽性を示した。

D. 考察

アドリアマイシンの単回投与実験では、いずれの群においても糸球体病変は認められたものの、最大耐量と考えられる 8 mg/kg 群においても十分な線維化病変は確認されなかった。一方、2 回投与実験においては、全投与群で糸球体病変が認められ、さらに 4 及び 6 mg/kg 群で線維化病変の形成が確認された。線維化病変は 6 mg/kg 群でより顕著であったため、アドリアマイシン誘発ラット線維化モデルの適切な投与条件は 6 mg/kg の 2 回投与と考えられた。

2 回投与実験の 4 及び 6 mg/kg 群の線維化病変内の拡張あるいは萎縮した尿細管に CD44 の発現が認められた。この結果は尿細管障害物質を用いた先行研究の結果と一致していたことから、CD44 は尿細管障害の原因に依らず再生異常尿細管に発現するものと考えられた。

来年度は引き続き、アドリアマイシン 6 mg/kg を 2 回投与したラットにおいて糸球体障害、CD44 発現及び線維化の病態形成を経時的に観察することにより、糸球体障害に続発する腎線維化における尿細管の再生異常と線維化形成の時系列を明らかにし、AOP 作製における KE 設定に資するデータを得る予定である。

E. 結論

糸球体障害物質であるアドリアマイシンによるラット腎線維化モデルの作製条件を検討し、6 mg/kg の 2 回投与に決定した。引き続き本モデルにおける病態形成を経時的に観察し、腎線維化の AOP 作製に資するデータの取得を目指す。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K, Toyoda T. Possible involvement of tubular interleukin-34 in macrophage recruitment during colistin-induced nephrotoxicity in rats, J Toxicol Sci. 2026;51:163-172. doi: 10.2131/jts.51.163.

F.2. 学会発表

1. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 赤木純一, 森川朋美, 水田保子, 小川久美子. 急性腎障害から慢性腎臓病への移行における CD44 の予測指標としての有用性の検証. 第 168 回日本獣医学会 (2025 年 9 月 4 日)
2. 松下幸平. 薬剤性腎障害の可逆性を予測する新規評価系の開発. 第 146 回日本薬学会 (2026 年 3 月 27 日)
3. Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K, Toyoda T. CD44 expression in renal tubules during maladaptive repair in AKI to CKD transition. World Congress of Nephrology 2026 (2026.03.30, Yokohama, Japan)

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

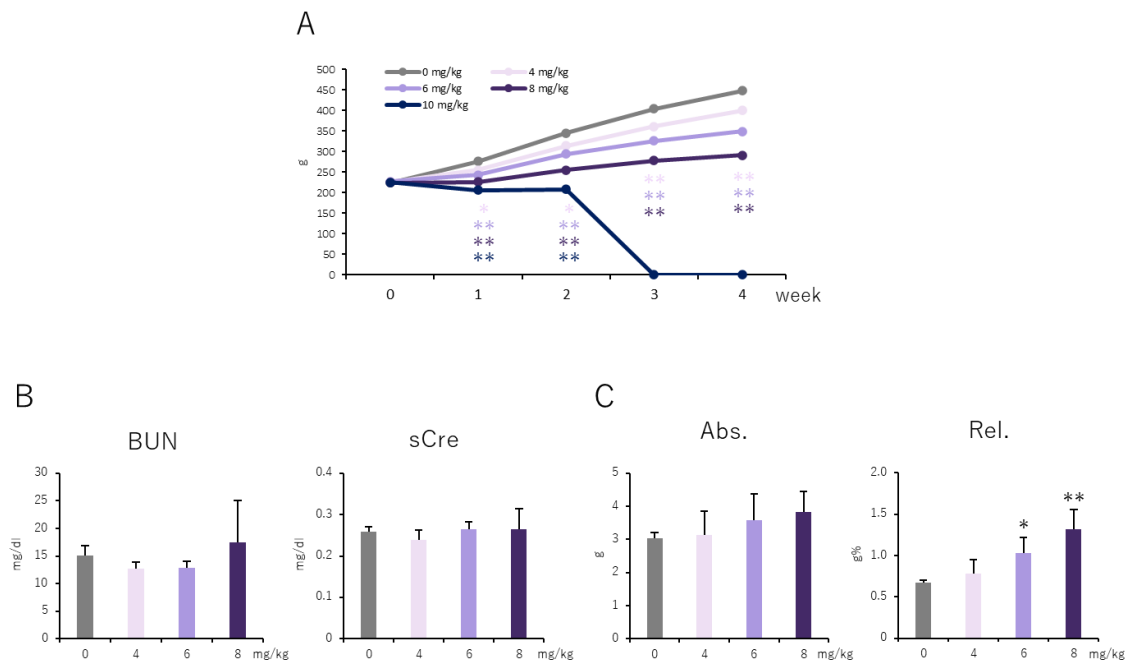


図1. 実験①における体重の推移 (A)、血清生化学的検査 (B) 及び腎重量測定 (C)。
*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 mg/kg。

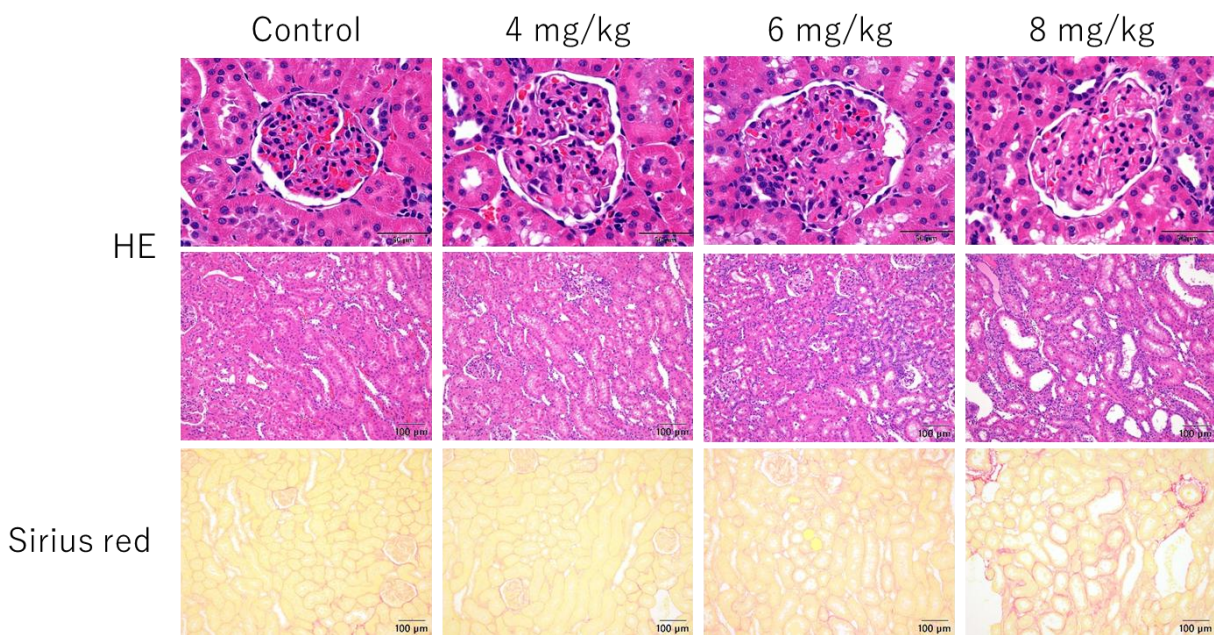


図 2. 実験①における病理組織学的解析。

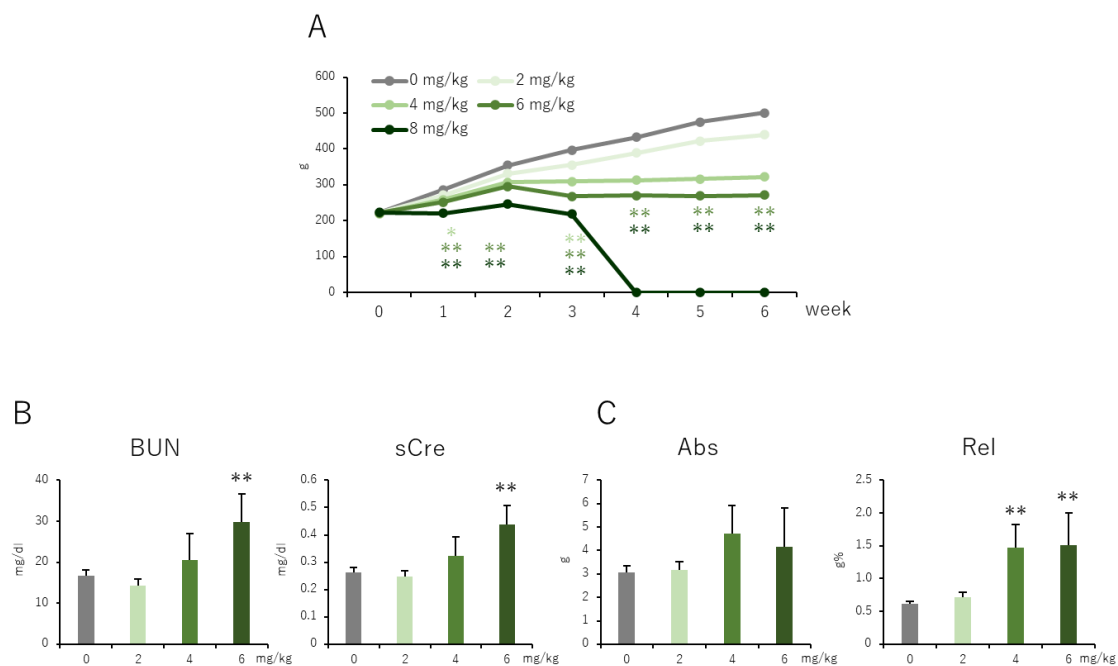


図 3. 実験②における体重の推移 (A)、血清生化学的検査 (B) 及び腎重量測定 (C)。

*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 mg/kg。

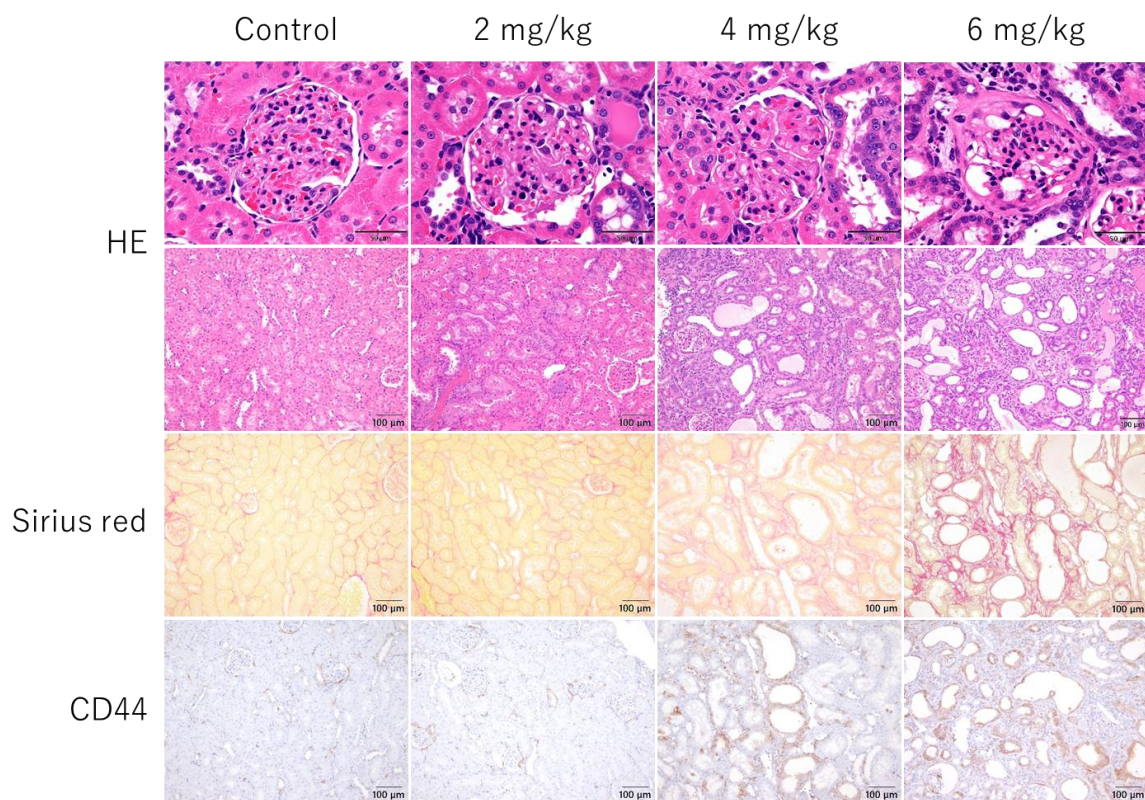


図 4. 実験②における病理組織学的解析。