

新生児ラットに *p*-cumylphenol を投与した時に生じる  
嚢胞腎の研究

(Cystic kidney induced by *p*-cumylphenol in neonatal rats)

2022年 2月

中澤 朋美

## 目次

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| 要約 .....               | 2         |
| 緒論 .....               | 7         |
| <b>第一章</b>             |           |
| <b>単回経口投与試験 .....</b>  | <b>12</b> |
| 1.1 序論 .....           | 13        |
| 1.2 材料と方法 .....        | 14        |
| 1.3 結果 .....           | 19        |
| 1.4 考察 .....           | 21        |
| 1.5 小括 .....           | 22        |
| <b>第二章</b>             |           |
| <b>反復経口投与試験 .....</b>  | <b>30</b> |
| 2.1 序論 .....           | 31        |
| 2.2 材料と方法 .....        | 32        |
| 2.3 結果 .....           | 36        |
| 2.4 考察 .....           | 39        |
| 2.5 小括 .....           | 45        |
| <b>第三章</b>             |           |
| <b>投与臨界期検討試験 .....</b> | <b>58</b> |
| 3.1 序論 .....           | 59        |
| 3.2 材料と方法 .....        | 62        |
| 3.3 結果 .....           | 67        |
| 3.4 考察 .....           | 70        |
| 3.5 小括 .....           | 76        |
| 総括 .....               | 91        |
| 謝辞 .....               | 96        |
| 引用文献 .....             | 97        |
| Abstract .....         | 106       |

## 要約

未だ全身諸臓器が形態的・機能的に発生段階にある新生児では、同一の外来化学物質に暴露された際に引き起こされる反応が成人と異なることが知られている。しかし、新生児または幼若動物に対する外来物質の影響を精査した研究報告は必ずしも多くない。そこで幼若動物に対する外来物質の安全性評価の一つとして、成獣と幼若動物で生じる毒性が異なることが知られている *p*-クミルフェノール (*p*-cumylphenol: PCP) を新生児ラットに投与し、腎臓に惹起される病変について病理学的解析を実施した。

PCP はフェノール誘導体として界面活性剤に使用されている他、ポリカーボネイトなどの可塑剤、殺虫剤並びに防腐剤などの用途に広く使用されている工業用化学物質である。これまでの報告から、PCP の投与により、成獣ラットでは腎臓に尿細管拡張や顆粒円柱、再生尿細管などがみられ、一方、新生児ラットでは腎臓に多発性嚢胞が惹起されることが知られている。これらの実験結果は PCP によって成獣と新生児ラットに引き起こされる毒性変化が異なることを示しているが、詳細には検討されていない。

出生後 4 日 (postnatal day 4: PND4) の新生児ラットに PCP を 600 mg/kg または 300 mg/kg の用量で単回経口投与したところ、600 mg/kg の用量で尿細管に拡張性の病変がみられたが、この用量は致死量であった。300 mg/kg の単回経口投与では腎臓に病理組織学的所見を誘発することが出来なかったものの、致死量を避け、すでに報告されている文献の結果を参考に反復経口投与試験では 300 mg/kg/日の用量を用いることとした。

反復経口投与試験では、PCP を 300 mg/kg/日の用量で新生児ラットに PND4 から投与を開始し、1 日 1 回 4、8、15 及び 18 日間経口投与した。それぞれを PND8、12、19 及び 22 剖検群とした。また、病変の回復性を検討する目的で、PND22 剖検

群の最終投与 1 週間後に剖検する回復群を設定した。そして、腎臓を病理組織学的に詳細に観察するとともに、嚢胞形成の成因の一つと考えられる細胞増殖の関与について増殖細胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen: PCNA）陽性率を評価した。PCP の 300 mg/kg/日の反復経口投与によって、PND19 及び 22 剖検群には髄質外帯に局在した大型の嚢胞が多発性に認められ、嚢胞腎の像を呈した。この多発性の嚢胞は、その形態から集合管由来であると考えられ、また、回復群の病態解析から可逆性であることが示された。一方、PND19 以降に髄質外帯の嚢胞に進行すると考えられる初期病変は、髄質外帯にも腎臓の他の部位にも PND12 までの群には何ら観察されないことから、PND19 及び 22 剖検群で観察された髄質外帯の集合管の嚢胞は PND12 と PND19 の間に形成されたものと考えられた。嚢胞化した集合管の上皮には高密度の核分布や高い PCNA 陽性率がみられたこと、そして、PCP の投与を中止すると、これらの細胞増殖活性の上昇を示す事象が消失することから、PCP は髄質外帯に分布する集合管上皮の増殖に腎臓の発生の特定の期間にだけ作用することが明らかとなった。

PCP が新生児ラットの腎臓に多発性の嚢胞を惹起するにあたり、投与時期によってその発生に明瞭な違いがみられたことから、PCP が嚢胞形成作用を発揮する投与臨界期が存在することが疑われた。そこで、PCP を 300 mg/kg/日の用量で PND14-28、21-35、28-42、35-49 及び 42-56 に 14 日間反復経口投与する実験を企画して嚢胞形成の投与臨界期を検討した。その結果、PND14-28 投与で髄質外帯に最も顕著な多発性の嚢胞が形成され、PND21-35 投与ではその程度が減弱した。対照的に PND28 以降の投与では嚢胞形成は認められなかった。また、PND21-35 投与の組織像と反復経口投与試験の投与 18 日後に 1 週間休薬した回復群にみられた組織像が類似していること、さらに PND28 以降の投与では嚢胞が発生しないことから、PND21-35 群の後半の 1 週間には PCP の嚢胞形成作用は消失しているものと推察さ

れた。さらに、反復経口投与試験の PND4-12 投与では嚢胞が形成されなかったところを合わせると、PCP の新生児ラットに対する嚢胞腎誘発の投与臨界期は PND14-28 であると判断された。

PCP 誘発性嚢胞腎についての亜連続標本による観察と抗アクアポリン 2 (AQP2) 抗体による免疫組織染色で腎臓の嚢胞をさらに詳細に評価した。亜連続標本による嚢胞の全体像の観察結果から、発生した嚢胞は髄質外帯に分布する正常の集合管の一部が局所的に嚢胞状に拡張したものであり、開放的に上流及び下流の尿流路と連続していること、腫瘍性への形質転換はないこと、嚢胞発生に閉塞性病変は関与しないことが示された。さらに、抗 AQP2 抗体の染色結果から、新生児ラットの腎臓における AQP2 は、発現分布に成獣ラットとの明らかな差はなく、また、髄質外帯で嚢胞状に拡張した集合管と周囲の正常集合管を比較しても AQP2 の発現分布に違いは認められなかったことから、PCP が新生児ラットに誘発する嚢胞の形成と AQP2 の関与を示すことはできなかった。

PND14-28 という嚢胞腎が発生する投与臨界期が存在することは、PCP が有する髄質外帯での集合管の嚢胞形成作用を発揮するために必要不可欠な分子がこの期間に限定的に発現していることを意味する。したがって、今後、新生児ラットの髄質外帯に分布する集合管に、この時期特有に変化する分子あるいは分子群を特定できれば、PCP や類似構造を持つ化学物質の腎障害についての病理発生機序を解明できるものと考えられた。

以上、PCP は新生児ラットの腎臓に多発性の嚢胞を形成すること、そして、嚢胞は髄質外帯に分布する集合管から発生する局在性の病変であることが検証された。そして嚢胞形成には当該部位の細胞増殖が関与している可能性が示唆された。さらに、嚢胞形成には PND14-28 の投与臨界期が存在することが示され、この投与臨界期には新生児ラット特有の腎臓の発生過程が深くかかわっているものと考えられ

た。よって、PCP の毒性試験では 4 週齢以上の動物を使用した場合、検出できない変化があることが示された。PCP のみの検証ではあるが、同様の事象が化学物質の幼若動物への投与では起こる可能性があり、毒性試験では幼若動物試験の実施も含め、試験に使用する動物の発生時期を考慮することは重要であると考えられた。

## 略称リスト

PND : postnatal day、出生後日数。出生日を PND 0 として起算する

PCP : *p*-cumylphenol、*p*-クミルフェノール

H・E : hematoxylin and eosin、ヘマトキシリン・エオジン

PCNA : proliferating cell nuclear antigen、増殖細胞核抗原、細胞周期の DNA 合成期の細胞の核で発現する抗原

AQP2 : aquaporin 2、水チャネル

ADPKD : autosomal dominant polycystic kidney disease、常染色体優性多発性嚢胞腎

ARPKD : autosomal recessive polycystic kidney disease、常染色体劣性多発性嚢胞腎

GW : gestation week、妊娠週齢

## 緒論

新規に開発されている医薬品などの安全性を評価するために種々の *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験を実施することが厚生労働省令で定められている（医薬品非臨床試験ガイドライン研究会 2020）。同様に、これらの非臨床試験は様々な化学物質の安全性評価にも必要とされており（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD online 1987）、それらの試験結果を基に製造労働者への安全暴露量や市場でのヒトにおける許容一日摂取量（acceptable daily intake : ADI）が決定される。

これらの非臨床試験では被験物質の暴露によって影響を受ける全身の各器官・組織が安全性の評価対象となっており、それぞれの機能的あるいは器質的变化が検査される。一方で、医薬品を始めとする人工的化学物質は外来物質として生体内に吸収された後、代謝過程を経て生体外に排泄されるが、多くは肝臓あるいは腎臓を介して排泄されることから、これらの器官は外来物質あるいはその代謝物に高濃度に暴露されることになり、その結果として有害作用を生じることが多い（Gu X and Manautou JE 2012; Barnett LMA and Cummings BS 2018）。従って、*in vivo* の非臨床試験を評価する際には肝臓及び腎臓には特段の注意が払われている。

実際に *in vivo* の非臨床試験で用いる動物種の第一選択肢となっているラットについての肝毒性あるいは腎毒性の研究報告は多く、それぞれの被験物質投与によって生じる形態学的特性ならびに毒性の発生机序が議論されている（Iqubala A *et al.* 2016; Gu X and Manautou JE 2012; Bartoli E 2016; Barnett LMA and Cummings BS 2018）。

ところが、報告の多くは成獣ラットに外来物質を暴露させたときに生じる毒性について記述されたものであり、幼若動物試験の実施は、厚生労働省令では成獣による非臨床試験の結果及び成人での使用経験から小児に対する安全性データが十分

でない場合に追加実施を検討すると記載され（医薬品非臨床試験ガイドライン研究会 2020）、OECD ガイドラインでは幼若動物試験の実施が定められていない（OECD online 1987）こともあり、新生児ラットまたは幼若ラットに対する外来物質の影響を精査した研究報告は必ずしも多くない。

非臨床試験ではヒトへの安全性を外挿評価するために各器官・組織の発生段階を考慮した試験系が望まれるが、ラットの腎臓はその発生時期がヒトとは大きく異なっていることが知られており（Zoetis T and Hurtt ME 2003）、ラットの新生児における毒性評価にはラット特有の発生時期を考慮する必要がある（Solhaug MJ *et al.* 2004; Seely JC 2017）。折しも最近では医薬品や化学物質のヒト新生児に対する安全性が着目されるようになり、医薬品の安全性評価についての非臨床試験ガイドラインが大きく改訂されたことで、より厳格な安全性評価が要求されている（European Medicines Agency online 2018）。

これらの背景を踏まえ、新生児ラットと成獣ラットに投与した際に毒性が異なることが報告されている化学物質を用い、ラットの新生児に外来物質を暴露させたときに生じる病変の評価、特に形態学的特徴に着目した研究を実施することとした。

まず、対象となる被験物質を選定した。非臨床試験のガイドラインでは対象となる医薬品の投与経路と同じ投与方法が推奨されているが（医薬品非臨床試験ガイドライン研究会 2020）、新生児ラットの大きさと血管の太さを考慮すると、筋肉内投与や腹腔内投与、静脈内投与などは投与操作が難しいものと判断した。さらに OECD ガイドラインでは成獣ラットへの投与方法として強制経口投与、混餌投与または混水投与が示されているが（OECD online 1987）、離乳前の新生児ラットでは混餌及び混水投与は不可能であるため除外した。よって、新生児ラットに反復投与するには経口投与が妥当な投与経路と考えられるため、経口投与に適した被験物質を模索した。また、研究対象は医薬品に限定することなく、広い領域での化学物質を対象

に範囲を広げることにした。

その結果、*p*-クミルフェノール (*p*-cumylphenol: PCP) という化学物質を見出した。*p*-クミルフェノール *p*-cumylphenol [*p*-( $\alpha$ ,  $\alpha$ -dimethylbenzyl) phenol] (PCP) はフェノール誘導体として界面活性剤に使用され、さらにポリカーボネイトなどの可塑剤、殺菌剤並びに防腐剤などの用途に広く使用されている工業用化学物質である。PCP の市場使用承認申請に際して規制当局には成獣ラットを用いた *in vivo* の非臨床試験が報告されている (European chemical agency: ECHA online 2005)。PCP を成獣ラットに 300 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与すると、雄ラットに腎尿細管の壊死及び再生が観察される。しかし、雌ラットでは同様の病変は生じない。また、ラットの新生児に離乳期 (出生後 21 日) から 7 週間にわたり 300 mg/kg/日の用量で反復経口投与しても腎臓に異常は認められない (ECHA online 2005)。一方、別の研究報告では PCP を新生児ラットに 300 mg/kg/日の用量で出生後 4 日目から 21 日目にかけて反復経口投与した際に、雌雄ともに腎尿細管の拡張が惹起され、多発性嚢胞腎様の病理組織像を呈する (Hasegawa R *et al.* 2005)。このように PCP は同じ化学物質であっても成獣ラットと新生児ラットに生じる腎臓の所見には違いが認められ、さらに新生児ラットであってもその投与時期によっては毒性学的反応が異なるという毒性学的プロファイルを有する化学物質である。これらの実験結果は PCP によって引き起こされる毒性変化が成獣ラットと新生児ラットで異なることを示しているが詳細には検討されていない。

このような背景を踏まえながら、幼若動物に対する外来物質の安全性評価の一つとして、PCP を新生児ラットに投与した際に惹起される嚢胞腎について病理学的に解析を実施した。

第一章では PCP が新生児ラットの腎臓に及ぼす毒性プロファイルを探るため、そして実験を進めるにあたり反復経口投与での投与量を検討する目的で実施した

新生児ラットを用いた PCP の単回経口投与試験について述べる。

続く第二章では、第一章で得られた情報を基にして実施した試験より、PCP を新生児ラットに反復経口投与したときに誘発される腎臓の嚢胞を形態学的に特徴づける。さらに、嚢胞形成の成因の一つと考えられている細胞増殖の関与について検討する。

第三章では、PCP が新生児ラットの腎臓に嚢胞を惹起するにあたり、投与時期に臨界期があることを示すとともに、嚢胞の組織発生について、再度の検討を行う。

なお、第三章にて、PCP により腎臓に誘発される嚢胞状変化は病理組織学的に集合管の局所的な開放性の嚢胞状拡張であり、閉鎖性の「嚢胞構造」を呈していないことが明らかとなった。ヒトの常染色体劣性多発性嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease: ARPKD) でも、病変は開放性の多発性嚢胞状構造からなることから (中西浩一、吉川徳茂 2012)、本研究においても PCP により誘発された腎臓の変化を「嚢胞腎」、また、集合管の嚢胞状拡張の組織像を「嚢胞」と称することとした。

ここに報告する一連の実験はすべてが動物福祉に関わるガイドラインならびに法規制に準拠して実施されており (下記)、株式会社ボゾリサーチセンターにおける動物実験委員会 (2007 年 5 月) または Institutional Animal Care and Use Committee (承認番号: G120241) の承認を得ている。

関連法令及びガイドライン

「動物の愛護及び管理に関する法律」 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)

「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)

「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」 (日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日)

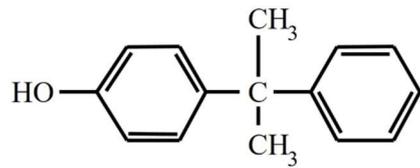
【被験化学物質】

CAS No. : 599-64-4

化学名 : 4 - ( 1 - メチル - 1 - フェニルエチル ) フェノール

英語名 : *p*-cumylphenol

構造式 :



分子式 : C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O

分子量 : 212.29

形状 : 乾燥粉末

色 : 白色ないし淡褐色

融点 : 335°C

## 第一章

### 单回経口投与試験

## 1.1 序論

新生児では全身の様々な器官・組織が未だ発生段階にあるため、生体機能が成人とは異なっており、外来化学物質に対する反応も異なる (Snodgrass WR 1992)。例えば、化学物質の吸収能力が異なること、または成人に比べて代謝能力が低いことにより、同じ化学物質を投与しても発生段階により体内動態が異なる可能性がある。Hasegawa ら (2005) は 6 種の化学物質を新生児ラットと成獣ラットに投与し、それらの無毒性量 (no-observed-adverse-effect-level: NOAEL) が新生児と成獣で異なることを報告している (Hasegawa R *et al.* 2005)。

先の Hasegawa ら (2005) の報告によると、PCP の投与により成獣ラットでは腎臓に尿細管拡張や顆粒円柱、再生尿細管などがみられる。一方、新生児ラットでは尿細管の顕著な拡張による多発性嚢胞が惹起される (Hasegawa R *et al.* 2005)。

PCP 投与により新生児ラットの腎臓に生じる病変をより詳細に解析するにあたり、まずは PCP を新生児ラットに単回経口投与した際の病理組織学的検査に関する報告がないため、新生児ラットの腎臓に及ぼす毒性プロファイルを探るため、そして実験を進めるにあたり最適な投与量を検討する目的で PCP の単回経口投与試験を実施した。

## 1.2 材料と方法

### 1.2.1 動物および飼育環境

妊娠した 5 匹の Sprague-Dawley 系ラット[CrI:CD(SD)]を日本チャールス・リバー株式会社（神奈川）より購入し、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の動物実験室で自然分娩させた。個体識別のために母動物は入荷時に動物の尾にマーキングを施した。試験日を表すにあたり、新生児の出生日を postnatal day (PND) 0 と規定した。PND3 に全ての新生児の中から外観、体長及び運動性の観察により異常のない個体を雌雄各 25 匹選抜した。次に、これら新生児を雌雄毎に同日の体重に基づいて層別化し、無作為抽出法により 1 母動物が哺育する新生児の平均体重がほぼ均等となるように母動物 1 匹当たり雄 5 匹及び雌 5 匹の新生児を割り当てて、母動物 5 匹（母動物番号 1-5）に雌雄計 50 匹を改めて哺育させた（Fig. 1）。試験に供した新生児には群分け時に動物の臀部に個体識別用にマーキングを施した。

全ての動物は温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $50 \pm 20\%$ 、換気回数 1 時間に 10-15 回、照明 1 日 12 時間（7:00～19:00）の動物飼育室で飼育した。入荷～実験期間中は、母動物及び新生児を床敷（ホワイトフレック：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製エコンゲージ（W340×D450×H185 mm：日本クレア株式会社、東京）に 1 母動物単位で飼育した。全ての母動物は固形飼料 CRF-1（放射線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社、東京）を自由に摂取させた。水は御殿場市営水道水を給水ビンにより自由に摂取させた。

### 1.2.2 被験化学物質の調整

- 被験化学物質

*p*-クミルフェノール (*p*-cumylphenol: PCP) (CAS No. 599-64-4、サンテクノケミカル、東京)

- 媒体

オリーブ油（丸石製薬株式会社、大阪）

- 調整方法

- 1) 必要量の PCP を秤量（濃度 30 mg/mL または 60 mg/mL）。
- 2) 1) をアルミナ乳鉢に移し、媒体を加えながら溶解。
- 3) 2) をメスシリンダーに移し、乳鉢を少量の媒体で数回共洗い。
- 4) 3) に媒体を加え所定濃度とし、メスシリンダーの口をパラフィルムで密封し、よく転倒混和。
- 5) 4) を適当な大きさのビーカーに移し、スターラーで攪拌しながら黒色ポリ容器に分注。
- 6) 投与日まで冷蔵庫内（設定 4℃）に保存。PCP は調整後、室温保存で 3 時間、冷蔵（設定 4℃）遮光下保存で 8 日間安定であることが証明されている（化合物安全性研究所 1999 b）。

### 1.2.3 試験群及び被験化学物質の投与

PCP の投与量は Hasegawa ら（2005）の報告で反復投与により尿細管の拡張が報告されている 300 mg/kg 及びさらに強い病変が誘発できることを期待して、その 2 倍量である 600 mg/kg を設定し、媒体対照群を加え 3 群構成とした。投与容量はラットの経口投与における標準的容量とされている 10 mL/kg 体重とし、PND4 に胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。個体ごとの投与液量は投与日の体重を基準に算出し、投与は母動物単位で実施した。

また、それぞれの投与量について PCP の単回投与後、24 時間、72 時間及び 7 日間の観察後に剖検する剖検群を設定した。それぞれを 24 時間後剖検群（24 hour Group: 24hG）、72 時間後剖検群（72 hour Group: 72hG）及び 7 日後剖検群（7 day Group: 7dG）とした。24hG は対照群に雌雄各 1 匹、投与各群に雌雄各 2 匹の計 10

匹、72hG 及び 7dG は対照群に雌雄各 2 匹、投与各群に雌雄各 4 匹の計 20 匹とした。群構成を Table 1 に示した。群分け後の新生児は、性別及び群ごとに 4 桁の動物番号をつけ識別した。動物番号の付け方は、1000 の位が群（対照群 1、PCP 300 mg/kg 投与群 2、600 mg/kg 投与群 3）、100 の位が性（雄 0、雌 1）、10 と 1 の位は個体番号とした。観察期間中は全新生児について、外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察し、母動物については哺育状態を観察した。また、投与後 24 時間、72 時間、5 日及び 7 日に生存例について体重測定を実施した。体重測定は 5 日後については一般状態観察時に、それ以外は剖検時に実施した。

#### 1.2.4 剖検

投与後 24 時間、72 時間及び 7 日の計画剖検時まで生存した新生児ならびに観察期間中に一般状態不良により瀕死に陥り動物福祉の観点から安楽死させた新生児は、エーテル麻酔下で腹大動脈切断による放血によって安楽死させ、外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行った。生存例については麻酔前に体重を測定した。観察期間中に死亡した新生児は発見後、速やかに剖検に供した。生存例及び安楽死動物は剖検時に両側の腎臓を採取し、器官重量を測定した後、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

#### 1.2.5 病理標本作製

全ての腎臓について常法に従いパラフィン包埋を実施し、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本作製し、病理組織学検査を実施した。

##### 1.2.5.1 ヘマトキシリン・エオジン染色

###### 【試薬】

- ・カラッチヘマトキシリン染色液

ヘマトキシリン（MERCK、東京）、硫酸カリウムアルミニウム・12水（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪）、ヨウ素酸ナトリウム（富士フイルム和光純薬株式会社）、グリセリン（富士フイルム和光純薬株式会社）

・エオジン染色液

エオジン Y（MERCK）、エタノール（富士フイルム和光純薬株式会社）、酢酸（富士フイルム和光純薬株式会社）

【調整】

・カラッチヘマトキシリン染色液 1000 mL に対して

ヘマトキシリン 1 g、硫酸カリウムアルミニウム・12水 50 g、ヨウ素酸ナトリウム 0.2 g を精製水 800 mL（メスアップ）に混合溶解し、グリセリン 200 mL を加え、ろ過する。

・エオジン染色液

エオジン Y を精製水に混合溶解し、1%エオジン液とし、80%エタノールで 4 倍希釈した後、400 mL に対して酢酸を 0.7 mL 加える。

#### 1.2.5.2 病理組織学検査

全ての腎臓の H・E 染色標本を光学顕微鏡下で観察した。腎臓の所見は Fig. 2 に示すように腎臓を成獣ラットの組織学的分類（Khan KNM and Alden CL 2002）を参考に皮質、髄質外帯、髄質内帯基部、腎乳頭先端部に分けて観察し、各所見のグレードは著変なし（－）、軽微（±：対物レンズ 4 倍以下の弱拡大での判別が容易でない弱いまたは微小な変化が少数みられる）、軽度（＋：対物レンズ 4 倍以下の弱拡大で容易に判別できる病変が散見される、または病変がびまん性にみられる場合には標本の 10～50%程度を占める）、中等度（++：対物レンズ 4 倍以下の弱拡大で容易に判別できる病変が標本の 50～70%程度の広範囲にみられる）、高度

(+++ : 対物レンズ 4 倍以下の弱拡大で容易に判別できる病変が標本の 70%以上の広範囲にみられる) の 5 段階評価とした。

#### 1.2.6 統計学的処理

体重及び器官重量(絶対及び相対重量)は平均値±標準偏差(SD)で示した。ただし、サンプル数が 2 以下である項目については平均値または個体値のみを示した。

各観察群は観察終了まで同様の操作を実施しているため、各体重測定ポイントの測定値は観察群に関わらず、投与量毎にまとめ、媒体対照群とそれぞれの投与群の間で F 検定(有意水準: 5%)及び t 検定(有意水準: 両側 5%)を実施した。

器官重量(絶対及び相対重量)については媒体対照群がサンプル数 2 以下のため統計解析を実施しなかった。

## 1.3 結果

### 1.3.1 死亡率

PCP を 600 mg/kg で投与した新生児では投与 24 時間以内に雄 4 匹及び雌 3 匹が死亡し、雄 1 匹及び雌 1 匹が一般状態不良により安楽死の経過を取った（死亡率 45%）。600 mg/kg 投与群で多数の動物が 24 時間以内に死亡したことから、24hG、72hG 及び 7dG 各群における評価対象動物数を確保するために投与後 24 時間時点で 600 mg/kg 投与群における各剖検群への動物の割り当てを再構築した。その際、安楽死させた雌 1 匹については 24hG と同時に剖検を実施したため、24hG とした。その結果、600 mg/kg 投与群の構成は 24hG : 雄 2 匹、雌 1 匹、72hG : 雄 1 匹、雌 3 匹、7dG : 雄 2 匹、雌 3 匹となった (Table 2)。

### 1.3.2 体重及び器官重量

雌雄とも 600 mg/kg 投与群の 24hG 及び 72hG、300 mg/kg 投与群の 24hG の体重が対照群と比較して低値を示した (Fig. 3)。腎臓の重量は統計解析を実施することができなかったが、絶対重量では雌の 600 mg/kg 投与群の 7dG で低値傾向を示し、相対重量では雌の 600 mg/kg の 72hG で高値傾向を示した。300 mg/kg では対照群と同等の傾向であった (Fig. 4)。雌の 600 mg/kg の 24hG の相対重量は当該動物が瀕死例であり体重重量の欠測のため算出することができなかった。

### 1.3.3 剖検

全ての個体において、剖検時に肉眼的異常はみられなかった。

### 1.3.4 病理組織学検査

腎臓を病理組織学的に検査したところ、600 mg/kg 投与群に生じた試験期間途中の死亡または瀕死期剖検例では髓質内帯基部及び髓質外帯の尿細管に軽微な拡張

がみられた。

生存例では 300 mg/kg 投与群の 24hG、72hG 及び 7dG のいずれの剖検群にも変化はみられなかった。600 mg/kg 投与群では 24hG の雌雄で腎臓の髓質内帯基部及び髓質外帯に尿細管の軽微な拡張及び雄で好中球浸潤 (Fig. 5 a-1, b-1) が、72hG では雌雄の髓質内帯基部及び雌の髓質外帯に尿細管の軽微な拡張がみられ、さらに雄の髓質内帯基部の尿細管上皮及び雌雄の腎乳頭先端部の乳頭管上皮に数的に軽微な単細胞壊死がみられた (Fig. 5 c-1)。いずれの所見も左右差はみられなかった。新生児の尿細管は無処置動物でも拡張を示し、かつ単細胞壊死も観察されるため、それぞれ媒体対照群と比較して尿細管径の大きいもの、単細胞壊死の数が多いものを所見として取り上げた。7dG では変化はみられなかった (Table 3)。

#### 1.4 考察

PCP をラットの新生児に PND4 で単回経口投与した結果、600 mg/kg 投与群で投与 24 時間以内に死亡あるいは一般状態不良から瀕死に陥る例が多く生じたことから、600 mg/kg はラットの新生児に対して最大耐量を超える致死量と判断された。また、300 mg/kg では死亡例または瀕死例はみられなかったことから、推定最小致死量は 300–600 mg/kg であった。なお、既報によると成獣ラットでは 2000 mg/kg でも死亡例はなく、致死量は 2000 mg/kg 以上であり（化合物安全性研究所 1999 a）、新生児ラットでの致死量は成獣ラットに比べて大きく下回った。剖検時に肉眼所見は観察されず、病理組織学検査は腎臓しか実施していないため、死亡の原因は推察できなかった。

一方、600 mg/kg 投与群の腎臓には 24hG 及び 72hG で病理組織学的に髄質内帯基部及び髄質外帯に尿細管の軽微な拡張がみられ、PCP が有する尿細管拡張作用を惹起する単回用量は 600 mg/kg であることが示唆された。また、7dG には同様の所見が観察されなかったことから PCP 単回経口投与による尿細管拡張作用は一過性かつ可逆性であると考えられた。

以上の結果より、引き続き予定している新生児ラットを用いた PCP の反復経口投与試験では、600 mg/kg は腎臓に変化がみられたものの、致死量であるため使用を避け、また、反復投与することによって致死量が低くなることが予想されるため、Hasegawa ら（2005）の報告と同様に 300 mg/kg/日の用量を用いることとした。

## 1.5 小括

PCP を 600 mg/kg または 300 mg/kg の用量で PND4 の新生児ラットに単回経口投与した結果、腎臓の尿細管に拡張病変が惹起された。しかし、その病変の惹起用量は 600 mg/kg であり、この用量は致死量でもあった。単回経口投与の結果を踏まえて PCP の新生児ラットにおける反復経口投与試験における用量を設定するにあたり、致死量を避け、さらに致死量は反復投与によって低くなる可能性があるため、単回経口投与では腎臓に病変は誘発されなかったが Hasegawa ら (2005) の報告と同様に 300 mg/kg/日を使用することとした。

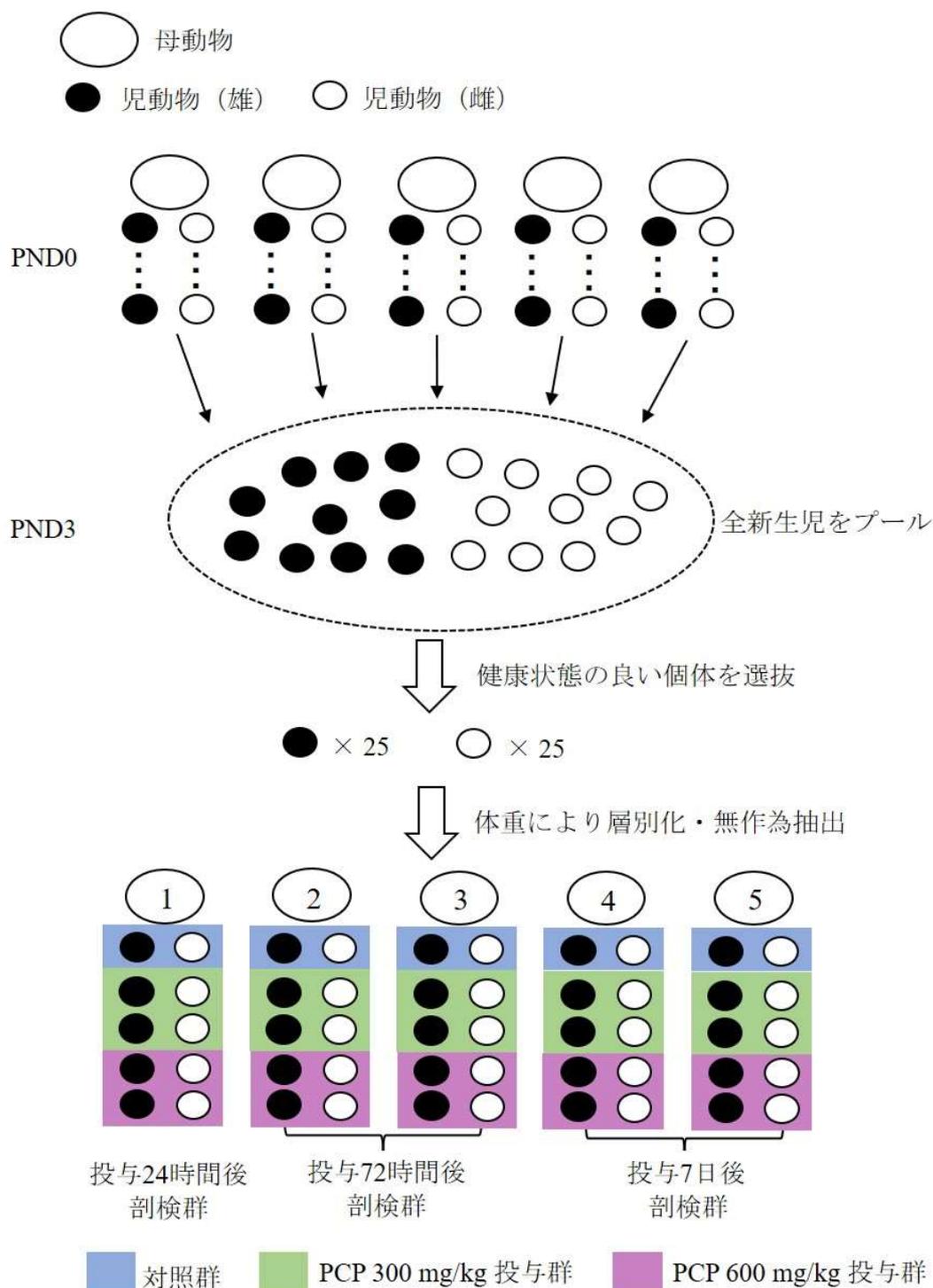


Fig. 1 PCP 単回経口投与試験 群構成方法

新生児の出生日を postnatal day (PND) 0 と規定した。PND3 に全ての新生児の中から健康状態の良い個体を雌雄 25 匹ずつ選抜し、雌雄ごとに体重に基づいて層別化し、無作為抽出法により 1 母動物が哺育する新生児の平均体重がほぼ均等となるように母動物 1 匹あたり雄 5 匹及び雌 5 匹の新生児を割り当て、哺育させた。剖検群は母動物単位とした。

Table 1 PCP 単回経口投与試験 群構成

| 剖検群     |           | 24hG |      | 72hG |      |      |      | 7dG  |      |      |      |
|---------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 母動物番号   |           | 1    |      | 2    |      | 3    |      | 4    |      | 5    |      |
| 新生児群/性  |           | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    |
| 新生児動物番号 | 0 mg/kg   | 1001 | 1101 | 1002 | 1102 | 1003 | 1103 | 1004 | 1104 | 1005 | 1105 |
|         | 300 mg/kg | 2001 | 2101 | 2003 | 2103 | 2005 | 2105 | 2007 | 2107 | 2009 | 2109 |
|         |           | 2002 | 2102 | 2004 | 2104 | 2006 | 2106 | 2008 | 2108 | 2010 | 2110 |
|         | 600 mg/kg | 3001 | 3101 | 3003 | 3103 | 3005 | 3105 | 3007 | 3107 | 3009 | 3109 |
|         |           | 3002 | 3102 | 3004 | 3104 | 3006 | 3106 | 3008 | 3108 | 3010 | 3110 |

24hG : 24 時間後剖検群、72hG : 72 時間後剖検群、7dG : 7 日後剖検群

群構成時の動物の振り分け。

表中の動物番号は 1000 の位が群（対照群 1、PCP 300 mg/kg 投与群 2、600 mg/kg 投与群 3）、100 の位が性（雄 0、雌 1）、10 と 1 の位は個体番号とした。

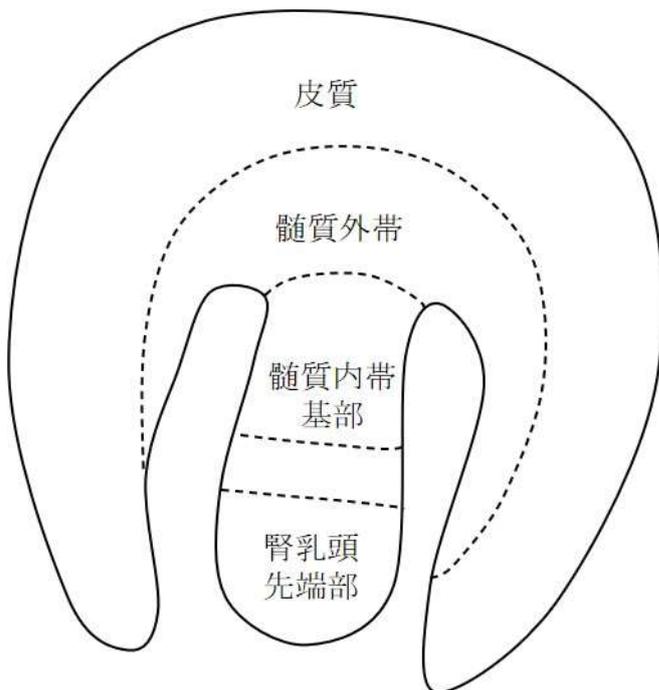


Fig. 2 病理組織学検査評価部位

単回経口投与試験及び反復経口投与試験における病理組織学検査評価部位。

皮質、髓質外帯、髓質内帯基部、腎乳頭先端部に分けて病理組織所見を観察した。

Table 2 PCP 単回経口投与試験 最終評価時群構成

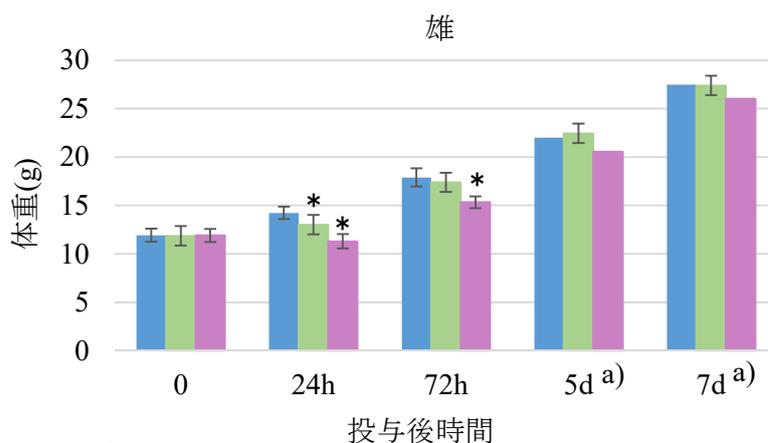
| 剖検時期    |           | 24hG |       | 72hG |      |      |      | 7dG  |      |      |      |
|---------|-----------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 新生児群/性  |           | 雄    | 雌     | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    | 雄    | 雌    |
| 新生児動物番号 | 0 mg/kg   | 1001 | 1101  | 1002 | 1003 | 1102 | 1103 | 1004 | 1005 | 1104 | 1105 |
|         | 300 mg/kg | 2001 | 2101  | 2003 | 2004 | 2103 | 2104 | 2007 | 2008 | 2107 | 2108 |
|         |           | 2002 | 2102  | 2005 | 2006 | 2105 | 2106 | 2009 | 2010 | 2109 | 2110 |
|         | 600 mg/kg | 3005 | 3104* | 3010 | -    | 3101 | 3103 | 3001 | 3007 | 3106 | 3110 |
|         |           | 3008 | -     | -    | -    | 3105 | -    | -    | -    | 3107 | -    |

\* : 投与後 24 時間に瀕死期剖検

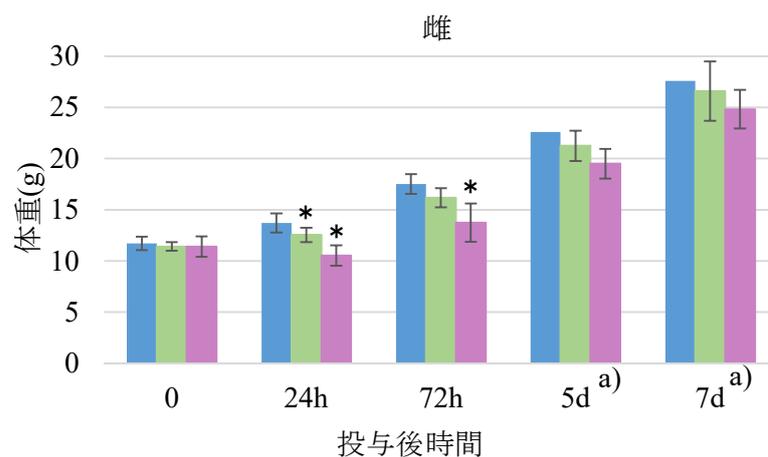
24hG : 24 時間後剖検群、72hG : 72 時間後剖検群、7dG : 7 日後剖検群

投与 24 時間後に死亡例及び瀕死例（表中の欠番）を試験系から除外して再構成した群構成を示す。

ただし、動物番号 3104 については 24hG と同時に剖検したため、24hG 扱いとした。表中の動物番号は 1000 の位が群（対照群 1、PCP 300 mg/kg 投与群 2、600 mg/kg 投与群 3）、100 の位が性（雄 0、雌 1）、10 と 1 の位は個体番号とした。



| サンプル数     | 0  | 24h | 72h | 5d | 7d |
|-----------|----|-----|-----|----|----|
| 対照群       | 5  | 5   | 4   | 2  | 2  |
| 300 mg/kg | 10 | 10  | 8   | 4  | 4  |
| 600 mg/kg | 10 | 5   | 3   | 2  | 2  |



| サンプル数     | 0  | 24h | 72h | 5d | 7d |
|-----------|----|-----|-----|----|----|
| 対照群       | 5  | 5   | 4   | 2  | 2  |
| 300 mg/kg | 10 | 10  | 8   | 4  | 4  |
| 600 mg/kg | 10 | 5   | 6   | 3  | 3  |

Fig. 3 PCP 単回経口投与試験 体重

X 軸に体重測定を実施した投与後時間を、Y 軸に各群の体重の平均値 (g) 及び標準偏差 (エラーバー) を示す。

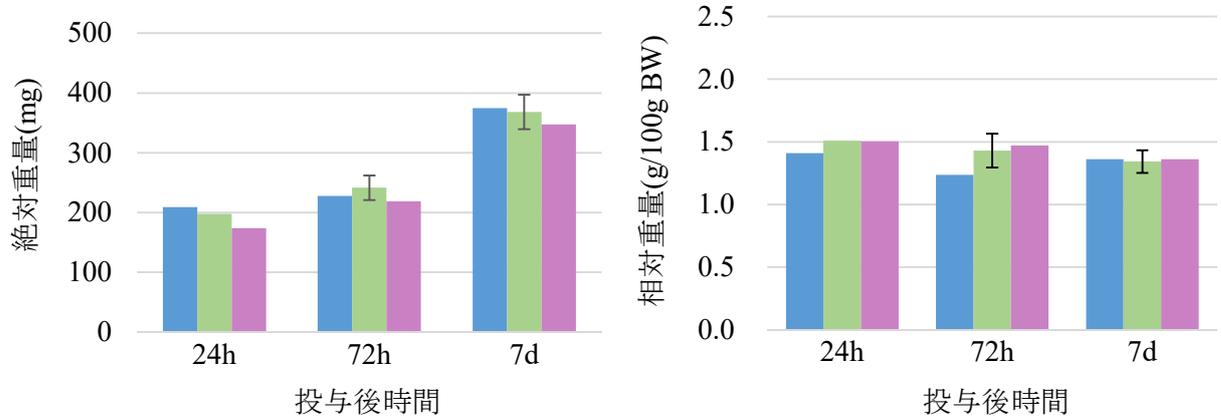
■ : 対照群、■ : PCP 300 mg/kg 投与群、■ : PCP 600 mg/kg 投与群

\* : 対照群との比較で有意差あり (t 検定、 $p < 0.05$ )

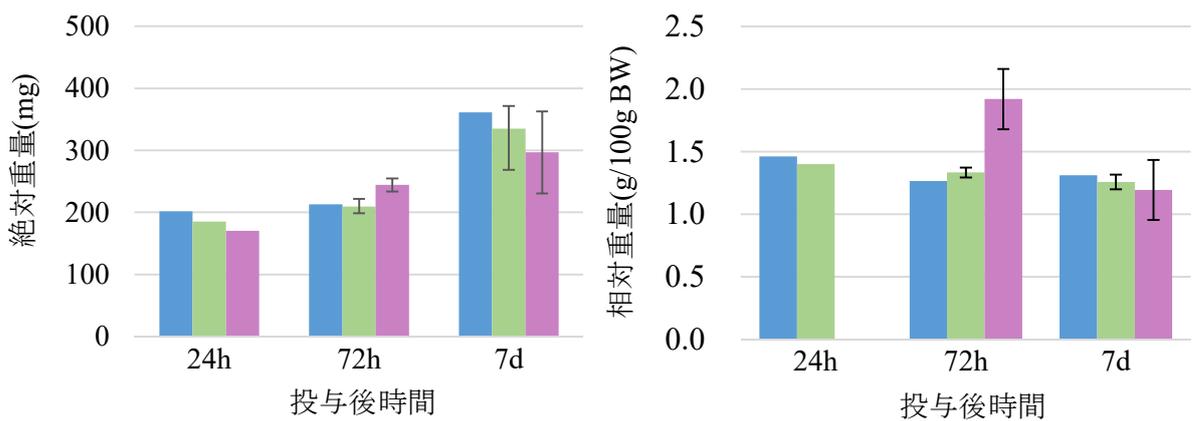
a) : 統計解析を実施せず。

h : 時間、d : 日

雄



雌



サンプル数 (雄)

|           | 24h | 72h | 7d |
|-----------|-----|-----|----|
| 対照群       | 1   | 2   | 2  |
| 300 mg/kg | 2   | 4   | 4  |
| 600 mg/kg | 2   | 1   | 2  |

サンプル数 (雌)

|           | 24h | 72h | 7d |
|-----------|-----|-----|----|
| 対照群       | 1   | 2   | 2  |
| 300 mg/kg | 2   | 4   | 4  |
| 600 mg/kg | 1   | 3   | 3  |

Fig. 4 PCP 単回経口投与試験 腎臓重量

X 軸に体重測定を実施した投与後時間を、Y 軸に各群の腎臓重量 (絶対・相対) の平均値及び標準偏差 (エラーバー) を示す。

■ : 対照群、■ : PCP 300 mg/kg 投与群、■ : PCP 600 mg/kg 投与群

h : 時間、d : 日

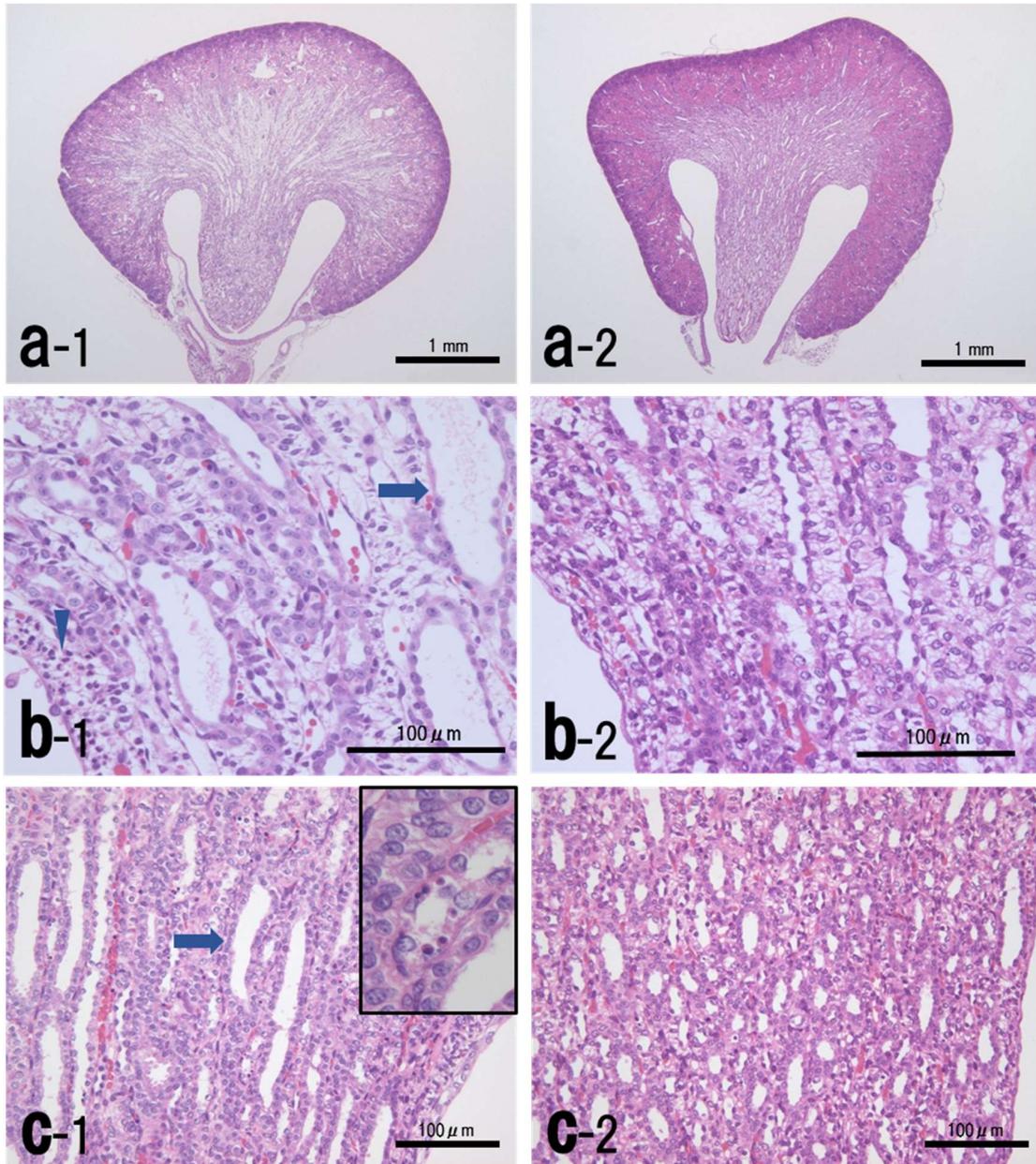


Fig. 5 PCP 単回経口投与試験 病理組織学検査

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 (a) 投与後 24 時間剖検群 (a-1 : 600 mg/kg 投与群、a-2 : 媒体対照群) (b) 投与後 24 時間剖検群・髓質内帯基部 (b-1 : 600 mg/kg 投与群、 $\rightarrow$  : 尿細管の拡張、 $\blacktriangledown$  : 好中球浸潤、b-2 : 媒体対照群) (c) 投与後 72 時間剖検群・髓質内帯基部 (c-1 : 600 mg/kg 投与群、 $\rightarrow$  : 尿細管の拡張、尿細管上皮の単細胞壊死・右上、c-2 : 媒体対照群)

Table 3 PCP 単回経口投与試験 病理組織学検査総括 (600 mg/kg 投与群)

|               |             | 剖検群: 24hG |   | 72hG |   | 7dG |   |
|---------------|-------------|-----------|---|------|---|-----|---|
|               |             | 雄         | 雌 | 雄    | 雌 | 雄   | 雌 |
| 検索数 (生存動物数) : |             | 2         | 1 | 1    | 3 | 2   | 3 |
| 髄質外帯          | 尿細管の拡張      | -, ±      | ± | -    | ± | -   | - |
|               | 好中球浸潤       | -, ±      | - | -    | - | -   | - |
| 髄質内帯<br>基部    | 尿細管の拡張      | ±         | ± | ±    | ± | -   | - |
|               | 好中球浸潤       | -, ±      | - | -    | - | -   | - |
|               | 尿細管上皮の単細胞壊死 | -         | - | ±    | - | -   | - |
| 腎乳頭<br>先端部    | 尿細管上皮の単細胞壊死 | -         | - | ±    | ± | -   | - |

-: 変化なし, ±: 軽微、観察されているグレードを記載した。

24hG : 24 時間後剖検群、72hG : 72 時間後剖検群、7dG : 7 日後剖検群

## 第二章

### 反復経口投与試験

## 2.1 序論

第一章で述べた新生児ラットに PCP を 300 mg/kg または 600 mg/kg で PND4 に単回経口投与した試験成績から、新生児ラットを用いた PCP の反復経口投与試験を 300 mg/kg の用量で実施することにした。

この反復経口投与試験では PCP が新生児ラットの腎臓に嚢胞を形成する過程を検討するために、300 mg/kg の用量で PCP を PND4 から投与開始し、異なる投与期間を 4 種類設定した。また、腎臓病変の可逆性を確認するために 1 週間の休薬期間後に検査する回復群を設けた。そして、PCP の反復経口投与により得られる嚢胞が惹起された腎臓を病理組織学的に詳細に観察し、さらに増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) に対する免疫組織化学染色を実施し、PCNA 陽性率により嚢胞形成に対する細胞増殖の関与について検討した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 動物および飼育環境

妊娠した 6 匹の Cri:CD(SD) 系ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の動物実験室で自然分娩させた。個体識別のために母動物は入荷時に動物の尾にマーキングを施した。試験日を表すにあたり、新生児の出生日を PND0 と規定した。PND3 に全ての新生児の中から健康状態のよい個体を雌雄各 25 匹選抜した。次に、これら新生児を雌雄毎に同日の体重に基づいて層別化し、無作為抽出法により 1 母動物が哺育する新生児の平均体重がほぼ均等となるように母動物 1 匹当たり雄 5 匹及び雌 5 匹の新生児を割り当て、哺育状態が良好な母動物 5 匹を選抜し（母動物番号 1-5）、雌雄計 50 匹を改めて哺育させた (Fig. 6)。試験に供した新生児には群分け時に動物の臀部に個体識別用にマーキングを施した。

動物の飼育環境及び餌・水については第一章の PCP 単回経口投与試験と同様に実施した。

### 2.2.2 被験化学物質の調整

被験化学物質の調整法ならびに保管条件は第一章の PCP 単回経口投与試験に準じて実施した。

### 2.2.3 試験群及び被験化学物質の投与

PCP の投与量は 300 mg/kg/日とし、媒体対照群と 2 群構成とした。投与容量は PCP の単回経口投与試験と同じく 10 mL/kg 体重とし、PND4 から 1 日 1 回、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。個体ごとの投与液量は PND4、8、12、15 及び 19 に体重を測定し、直前に測定した体重を基準に算出した。投与は母動物単位で実施した。腎臓における嚢胞形成過程を評価するために、異なる投与期間に基づく亜群を

4 群設定し、それぞれ PND4 から始めて 4、8、15 及び 18 日間にわたり経口投与した。これらの亜群をそれぞれ PND8、12、19 及び 22 剖検群と称する。さらに、18 日間投与後に 1 週間の休薬期間をおいた回復群を設け、腎臓所見の可逆性を評価した。試験デザインについて模式図を Fig. 7 に示した。各亜群の剖検動物数は、媒体対照群では雌雄各 2 匹、PCP 投与群では雌雄各 3 匹とした。群構成表を Table 4 に示した。群分け後の新生児は、性別及び群ごとに 4 桁の動物番号をつけ識別した。動物番号の付け方は、1000 の位が群（対照群 1、PCP 投与群 2）、100 の位が性（雄 0、雌 1）、10 と 1 の位は個体番号とした。

投与期間中はすべての新生児について、外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察し、母動物については哺育状態を観察した。

#### 2.2.4 剖検

各亜群の投与期間終了及び休薬期間終了の翌日に計画剖検を実施した。剖検時の体重を測定後、新生児をエーテル吸入麻酔下で腹大動脈切断による放血によって安楽死させ、外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行った。次いで、剖検時に両側の腎臓を採取し、器官重量を測定した後、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

#### 2.2.5 病理標本作製

全ての腎臓について常法に従って H・E 染色標本作製した。また、H・E 染色標本作製したものと同一のブロックから切片を薄切し、抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) マウスモノクローナル抗体を用いて、labeled streptavidin biotinylated antibody (LSAB) 法により免疫組織化学染色を施した。

### 2.2.5.1 ヘマトキシリン・エオジン染色

PCP の単回経口投与試験で用いた方法に準じて実施した。

### 2.2.5.2 免疫組織化学染色

染色手順を Table 5 に示した。

#### 【主な試薬】

- ・ Proliferating Cell Nuclear Antigen (M0879) (ダコ・ジャパン株式会社、東京)
- ・ Dako LSAB2 kit (ダコ・ジャパン株式会社)
- ・ DAB 錠 (富士フイルム和光純薬)
- ・ マイヤー・ヘマトキシリン染色液 (武藤化学株式会社、東京)

### 2.2.6 病理組織学検査

#### 2.2.6.1 ヘマトキシリン・エオジン染色標本

全ての腎臓の H・E 染色標本を PCP の単回経口投与試験で用いた方法に準じて光学顕微鏡下で観察した。

#### 2.2.6.2 細胞の増殖活性の評価

細胞周期の DNA 合成期の細胞の核で発現する抗原である PCNA に対する抗体を用いた免疫組織化学染色標本を用いて、腎臓の髄質外帯、髄質内帯基部及び腎乳頭先端部のそれぞれの領域をデジタル顕微鏡写真撮影装置で撮影し、デジタル画像上で集合管の細胞数及び PCNA 陽性細胞数を計測した。総カウント細胞数は媒体対照群では髄質外帯：18,941 個（雄）、14,561 個（雌）、髄質内帯基部：19,735 個（雄）、20,307 個（雌）、腎乳頭先端部：16,801 個（雄）、12,517 個（雌）、PCP 投与群では髄質外帯：20,379 個（雄）、20,264 個（雌）、髄質内帯基部：27,675 個（雄）、23,506 個（雌）、腎乳頭先端部：15,854 個（雄）、13,150 個（雌）であった。計測

結果から PCNA 陽性率を算出し、PCNA 陽性率から集合管上皮の増殖活性を評価した。

【デジタル顕微鏡写真撮影装置】

- ・ 3CCD デジタルカメラ FX380 (オリンパス、東京)
- ・ コンピューター Endeavor AT970 (EPSON、長野)
- ・ 画像解析ソフト FLVFS-LS (Ver.1.12) (フローベル、東京)

### 2.2.6.3 統計学的処理

体重、器官重量(絶対及び相対重量)及び PCNA 陽性率は平均値±標準偏差(SD)で示した。ただし、サンプル数が 2 以下である項目については平均値のみを示した。

PND8-22 剖検群は剖検時まで同様の操作を実施しているため、各体重測定ポイントの測定値は剖検群に関わらず、投与量毎にまとめ、媒体対照群と PCP 投与群の間で F 検定(有意水準:5%)及び t 検定(有意水準:両側 5%)を実施した。回復群については、媒体対照群のサンプル数が 2 のため、統計解析を実施しなかった。

器官重量(絶対及び相対重量)及び PCNA 陽性率については媒体対照群のサンプル数が 2 のため統計解析を実施しなかった。

## 2.3 結果

### 2.3.1 死亡率及び一般状態

試験期間中に死亡あるいは瀕死状態に陥った動物はいなかった。また、一般状態に異常がみられた動物もいなかった。

### 2.3.2 体重及び器官重量

体重は対照群と比較して PCP 投与群の雄の PND8、12、15 及び 19、雌の PND8、12 及び 15 の測定で低値がみられたが、一般状態の悪化を疑うような変動はみられなかった (Fig. 8)。

腎臓重量では雌雄の PND19、22 剖検群及び回復群で絶対重量及び相対重量ともに高値傾向を示した (Fig. 9)。

### 2.3.3 剖検

PCP 投与群では PND19 と PND22 剖検群及び回復群で、腎臓の大型化がみられた。

### 2.3.4 病理組織学検査

病理組織学検査結果の総括を Table 6 に示した。いずれの所見も左右差は見られなかった。

対照群では試験期間を通して特記すべき組織学的所見はみられなかった。

PND8 及び PND12 剖検群では雌雄の髓質内帯基部で軽微な尿細管の拡張がみられた (Fig. 10 b-1)。これら拡張した尿細管を内張する上皮は単層で小型の立方状を呈し、尿細管腔面には刷子縁などの組織分化は認められなかった。核は明るくほぼ中心に配し、核小体は小さく不明瞭であった。また、胞体は染色性に欠けることから細胞内小器官の発達は乏しいものと考えられた (Fig. 10 c-1)。拡張した尿細管に

観察されたこれらの組織学的特徴と、拡張尿細管の腎臓内における解剖学的配置から、拡張した尿細管は集合管であるものと考えられた（村井隆、副島昭治 2013）。もう一つの拡張集合管の特徴として、拡張の程度に雌雄差はみられなかったが、雌においてはわずかではあるが上皮の核密度が高くなっていた（Fig. 10 d）。また、腎乳頭先端部では雌雄で好中球浸潤がみられ、PND12 剖検群の雌 3 匹中 1 匹のみで軽微な乳頭部の壊死とそれに伴うと考えられる上皮の反応性過形成がみられた（Fig. 10 e）。

PND19 及び PND22 剖検群でも雌雄の髄質内帯基部に PND8 及び PND12 剖検群と同様に集合管の拡張が軽微から軽度にみられ、軽度の個体は雌にみられた。しかし、PND19 及び PND22 剖検群の最も特徴的な所見は髄質外帯で観察された。髄質外帯では雌雄で尿細管が多発性に嚢胞状に拡張し、嚢胞腎の像を呈していた（Fig. 11 a-1）。嚢胞腔の形態は主に髄質側が狭くなる楔型を呈していた。嚢胞状に拡張した尿細管は核密度が高く、丈の高い円柱状細胞が基底膜に沿って一層に配列しており、明るい核が細胞の中央に位置していた（Fig. 11 b-1）。PND8 及び PND12 剖検群と同様に管腔側には刷子縁などの組織分化の像は認められず、核小体や胞体の形態は髄質内帯基部で認められた拡張集合管の上皮と類似性を示した。これらの組織学的特徴が、PND8 及び PND12 剖検群ならびに PND19 及び PND22 剖検群の髄質内帯基部に生じた拡張集合管と類似していたことから、PND19 及び PND22 剖検群の髄質外帯で発生した嚢胞も当該部位の集合管に由来するものと推測された。

髄質外帯における嚢胞の腔内には、剥離した上皮細胞と思われる細胞残渣がみられる個体や嚢胞の周囲に限局性の好中球浸潤が観察された個体もいたが、1~3 カ所の管腔または嚢胞の周囲に数個みられる程度の弱いものだった。腎乳頭先端部では軽微から軽度の乳頭管の拡張がみられた（Fig. 11 c-1）。

回復群でも髄質外帯に嚢胞状に拡張した集合管が観察された。しかし、PND19 及

び PND22 剖検群にみられた嚢胞と比較して、形態的に嚢胞の数は減少するとともに嚢胞腔はより円形の形状を呈した。また、各嚢胞状集合管の上皮の細胞密度は低下するとともに、上皮丈は扁平化して生物学的に活性が低いと考えられる像となっていた (Fig. 12)。一方、皮質に好塩基性を呈する尿細管とリンパ球浸潤が散見された。

### 2.3.5 PCNA 陽性率

雌の PND8 剖検群の髓質内帯基部を除き、PCP 投与群では全ての投与終了時剖検群において、集合管の上皮細胞の PCNA 陽性率は高い傾向を示した。また、髓質外帯、髓質内帯基部及び腎乳頭先端部の比較では髓質外帯において高い傾向がみられた (Fig. 13, 14)。一方回復群では、対照群と同程度の PCNA 陽性率が認められた。

雄では各剖検群の対照群の平均 PCNA 陽性率が髓質外帯では 3~5%、髓質内帯基部では 0.3~2%、腎乳頭先端部では 1%未満と期間を通じて大きな変動はなかったが、雌では髓質外帯では 0.4~14%、髓質内帯では 0.03~15%、腎乳頭先端部では 1%未満と髓質外帯及び髓質内帯基部で変動が大きかった。さらにその変動に、日齢と共に PCNA 陽性率が上昇する等の腎臓の発生時期と相関すると考えられる傾向はみられなかった。一方投与群でも対照群の変動と相関すると考えられる傾向はみられなかった。

## 2.4 考察

PCP を 300 mg/kg/日 で新生児ラットに PND4 より反復経口投与した結果、PND19 及び PND22 に髄質外帯において多発性の集合管の嚢胞状拡張がみられており、これは Hasegawa ら (2005) の実験の結果と一致する。ラットの腎臓の髄質外帯には近位尿細管直部、遠位尿細管、集合管が分布している。このうち近位尿細管は上皮が大型で丈が高く、刷子縁を持つことから H・E 染色標本を用いた形態学的評価により、容易に他の管腔構造と識別できる。このことから Hasegawa ら (2005) の実験では嚢胞状の管腔の組織発生について、尿細管と乳頭管由来と記載されているが、この尿細管は遠位尿細管を指すものと考えられる。ところが、今回の実験結果では形態学的特徴及び解剖学的分布より嚢胞状を呈している管腔構造は集合管由来と判断した。この点については Hasegawa ら (2005) の報告と一致しないことから嚢胞の組織発生についてはさらなる検討が必要である。この議論については第三章に記すが、本章では本実験の診断結果に基づいた「集合管」を用いることとする。

PND8 及び PND12 剖検群では髄質内帯基部で軽微な集合管の拡張がみられたものの、髄質外帯の集合管には組織学的な変化はみられず、PND19 と PND22 剖検群の髄質内帯基部における集合管にも拡張が観察されたが、投与期間の延長に伴う拡張の程度の増強は確認されなかった。このように今回の実験では PND19 と PND22 剖検群でみられた嚢胞に進行すると考えられる、髄質外帯における軽微な拡張や細胞分裂像の増加などの初期病変は病理組織学的には検出できていない。つまり、髄質外帯に生じた嚢胞は PND12 と PND19 の間に形成されていたと考えられる。

嚢胞を形成する集合管の上皮は核密度が増加しており、細胞の形態も立方状または円柱状を呈していることから、嚢胞の形成要因が単に内腔の嚢胞液の貯留による物理的な拡張ではないことが示唆された。また、核密度の増加とともに PCNA 陽性率も増加していることから嚢胞の形成の原因として細胞の増殖活性の上昇が考え

られた。一方で嚢胞状拡張を示しておらず、核密度も増加していない PND8 及び 12 剖検群の髄質外帯の集合管及び全ての投与終了時剖検群の髄質外帯以外の集合管でも PCNA 陽性率の増加がみられていることから、PCP は集合管の細胞増殖を活性化させる作用を持つが、嚢胞化にはさらに細胞の分裂方向の統制が取れなくなり、不必要に管の直径を広げる方向に分裂するなどの集合管の構造を逸脱させる要因 (Igarashi P and Somlo S 2002) が必要であるものと推察された。また、増殖活性が上昇しているものの、嚢胞を内張する細胞は単層で基底膜に沿っていることから、細胞は極性を失っていないと考えられ、腫瘍細胞のような無秩序な増殖はしていないものと考えられる。このことは回復群において、嚢胞を構築する上皮の核密度が低下するとともに上皮が扁平化し生物学的活性が低下していると考えられる像を呈していたことから裏付けられている。

回復群では嚢胞は未だに完全に消失してはいなかったが、嚢胞状拡張を呈する集合管の数が減少したことから、集合管の嚢胞化現象は可逆性であると判断された。さらに、嚢胞を内張する上皮の核密度は低下しており、細胞形態も一部で扁平化していたことから細胞数の減少により集合管の形態を正常に戻す作用が働いているものと考えられた。また、PCNA の陽性率が低下しており、PCP 投与が髄質外帯に分布する集合管上皮の PCNA の陽性率上昇に作用すること、そして、PCP の投与を止めるとその増殖活性が消失することが示唆された。

腎臓で嚢胞及び嚢胞状病変が形成される要因の一つとして、尿の流路である尿細管または集合管の下流での閉塞による尿の貯留が考えられる。今回の実験では、腎乳頭先端部に PND8 剖検群で好中球浸潤が、PND12 剖検群で雌 3 匹中 1 匹のみ好中球浸潤と乳頭壊死及びそれに伴うと考えられる上皮の反応性過形成がみられた。この腎乳頭部の傷害により尿路が閉塞されて尿路上流部に閉塞性の嚢胞形成が起こった可能性は完全に否定できるものではない。しかし、これら腎乳頭部に病変が生

じたのは少数例であり、PND19 及び PND22 剖検群では全く同病変が観察されていない点は説明ができない。そして、仮に閉塞性病変であれば、閉塞を起こした箇所から連続的に乳頭管から集合管を経て尿細管に拡張性・嚢胞性病変が観察されるものと推察され、今回の実験で認められたような、腎乳頭部から遠隔性かつ局所的に嚢胞を形成するという事実とは矛盾する。さらには、嚢胞状となった集合管の上皮はむしろ高くなっていたことを考え合わせると、PND8 及び PND12 剖検群でみられた腎乳頭先端部の好中球浸潤及び壊死並びにそれに伴うと考えられる上皮の反応性過形成は、髓質外帯に分布する集合管の嚢胞化には直接関係しないものと考えられた。

腎臓で嚢胞及び嚢胞状病変が形成される他の要因として、管腔を形成する上皮に増殖活性が付与されることによる構造的変化が挙げられる。今回の実験では、髓質外帯で集合管上皮が高い PCNA 陽性率を示したことから、PND19 及び PND22 剖検群では何らかの理由で該当域の集合管上皮に増殖活性刺激が加わったことが考えられる。

細胞が増殖して病理組織学的に過形成の像を呈するには大きく分けて二通りの様式が考えられている (Butterworth BE *et al.* 1992)。一つは組織が何らかの傷害を受け、細胞が壊死した後に元の組織構造を回復するために生理学的に生じる細胞増殖である。もう一つは、組織傷害がないにもかかわらず、化学物質や様々な要因により細胞に分裂促進因子 (マイトジェン、mitogen) としての増殖指令が働き、その結果、細胞が増殖するものである。前者は病理学的に「修復性あるいは再生性増殖 (reparative or regenerative hyperplasia)」 (Sanchez IM and Bull RJ 1990; Iatropoulos MJ *et al.* 1994; Wang Y *et al.* 2021; Bisht S *et al.* 2011)、後者は「複製性増殖 (replicative hyperplasia)」 (Lake BG *et al.* 1993) と呼ばれている。

修復性あるいは再生性増殖はラットの肝 2/3 部分切除で生じる肝臓の再生過程や

四塩化炭素（carbon tetrachloride: CCL4）などの細胞毒性物質で生じる細胞壊死後の組織修復過程で代表される。ラットの肝臓の 2/3 を外科的に切除すると、残存した肝細胞が分裂を始める（Higgins GM and Anderson RM 1931）。また、CCL4 でラットの肝小葉の Zone 3 を壊死させた際にも、周囲肝細胞が増殖する（Higgins GM and Anderson RM 1931; Michalopoulos GK 2010; Bisht S *et al.* 2011）。

一方、複製性増殖は何らかのマイトジェンが細胞に作用することで生じる。例えばクロフィブレート（clofibrate）のようなペルオキシソーム増生剤と呼ばれるクラス薬剤やフェノバルビタール（phenobarbital）はラットの肝細胞に過形成を惹起するが、細胞傷害性はみられない（Butterworth BE *et al.* 1987; Carthew P *et al.* 1998）。

これらの過形成は病理組織学的に「元の構造・大きさ」を維持するかどうかに関係なく大きな違いがみられ、修復性あるいは再生性増殖では組織傷害、つまり細胞が減少した分だけ増殖するので、当該器官は炎症作用で重量が増加するかも知れないが、器官自体の重量には大きな変動はない。肝 2/3 部分切除後では、約 4 週間でほぼ元の大きさに達したときに増殖が止まる（Higgins GM and Anderson RM 1931）。CCL4 でラットの肝小葉を傷害したときも、Zone 3 の肝細胞が修復して元の小葉構造が形成されると増殖が止まり、他に障害因子または増殖因子がなければ当該の肝組織は何事もなかったようにほぼ正常の組織に見える（増田康輔 2006）。このように元の構造を再構築すると増殖活性が消失する現象は肝臓のみならず腎臓や消化管などの他の臓器でも観察される。

複製性増殖では細胞傷害が先行しないので、既存の組織に新たに増殖した細胞が加わることになり、その分の重量増加を来す。そのためこの様式の過形成は「additive hyperplasia」（Butterworth BE *et al.* 1987）とも呼ばれる。管腔組織を形成する上皮の一部に複製性増殖が生じると、該当部位で細胞数が増加することから、正常の管腔構造に内腔に突出する隆起性構造が形成される、あるいは正常の管腔の一部が拡張

する。

PCP 投与によって新生児ラットの腎臓に生じた集合管の嚢胞は、嚢胞を形成する上皮の核密度が増加していること並びに増殖活性の指標である PCNA の陽性率が上昇していることから、細胞増殖が集合管の嚢胞化に大きな役割を担っている可能性がある。この PCP 投与が新生児ラットに誘発する嚢胞形成における細胞増殖を上記の 2 つの様式に分類してみる。

まず、PCP を成獣ラットに投与すると腎臓の尿細管傷害と再生が生じることが報告されている (European chemical agency: ECHA online 2005)。しかし、腎臓尿細管のどの分節を傷害するかは詳細な記載がない。本章の反復経口投与試験では、PND19 及び PND22 剖検群で細胞増殖を伴う嚢胞状拡張を示した集合管が分布する髄質外帯には、投与初期の検査である PND8 あるいは PND12 剖検群にも、嚢胞が形成されている PND19 及び PND22 剖検群にも細胞の壊死などの傷害像はみられていない。また、修復性あるいは再生性増殖では、元の構造を獲得するとその増殖活性は消失するので、尿細管傷害の後に続く上皮過形成はわずかな尿細管腔の拡張を来すことがあっても嚢胞状まで構造を逸脱するには至らないとされている (Seely JC and Brix A online 2014)。対照的に、PCP を投与した新生児ラットでは、明らかに正常構造を逸した大小の嚢胞が形成されており、細胞傷害性が確認されていないことも合わせて、嚢胞状に拡張した部位において PCP がマイトジェンとして働き、複製性増殖を惹起したものと推測された。

腎臓の髄質外帯、髄質内帯基部及び腎乳頭先端部における PCNA 陽性率は、雄に比べて雌でばらつく傾向が認められたが、これには性ホルモンの関与が疑われる。ラットまたはマウスの新生児における化合物誘発性の多発性嚢胞腎は *p*-ノニルフェノール (para-nonylphenol) (Latendresse JR *et al.* 2001) 及びテトラブロモビスフェノール A (tetrabromobisphenol A) (Fukuda N *et al.* 2004) で報告されている。*p*-ノニル

フェノールの投与により新生児ラットに誘発される嚢胞腎は主に髄質外帯において多くの嚢胞が形成され、嚢胞内に壊死した上皮や好中球を含む慢性間質性腎炎 (Latendresse JR *et al.* 2001) がみられ、テトラプロモビスフェノール A では腎臓の皮髄境界部に尿細管上皮細胞の過形成を伴う多発性嚢胞がみられる (Fukuda N *et al.* 2004)。これらの 2 化合物に共通して、共に内分泌かく乱物質としてエストロゲン作用が知られている (環境省 online 2010; 環境省 online 2014)。PCP を成獣ラットに投与すると、卵巣における閉鎖卵胞の増加や黄体数の減少及び子宮における内膜上皮の肥大などが生じていることから (Hasegawa R *et al.* 2005)、PCP はエストロゲン作用を有することが考えられる。一方で、腎臓の嚢胞形成には上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) 受容体の役割が示唆されている (Orellana SA *et al.* 1995)。エストロゲン受容体と EGF 受容体は相互作用によりそれぞれの働きを増強するので (Levin ER 2003)、雌では PCP 誘発性の細胞増殖効果がエストロゲンによって修飾された可能性が考えられた。

## 2.5 小括

PCP を 300 mg/kg/日の用量で新生児ラットに PND4 から経口投与を開始し、4、8、15 及び 18 日間、1 日 1 回反復経口投与後、それぞれ PND8、12、19 あるいは 22 に剖検した。また、18 日間の最終投与後 1 週間の休薬期間を設けた回復群を設定した。腎臓を病理組織学的に検査したところ、PND19 及び 22 剖検群には髄質外帯に局在した多発性の嚢胞が認められた。この多発性の嚢胞は、回復群の組織像から、可逆性であることが示された。一方、髄質内帯基部には PND8、12、19 及び 22 剖検群で軽微な拡張集合管が認められたが、髄質外帯に嚢胞がみられた PND19 及び 22 剖検群と嚢胞がみられていない PND8 及び 12 剖検群において髄質内帯基部の集合管の拡張の程度に差が無かったことから、髄質外帯の嚢胞とは独立した病変と考えられた。また、集合管が嚢胞状に拡張した領域の分布域を考慮すると、PND8 及び 12 剖検群の少数例に観察された腎乳頭先端部の病変によって、閉塞性に集合管が嚢胞化したとは考えられなかった。したがって、PND19 及び 22 剖検群で観察された髄質外帯の集合管の嚢胞状拡張は PND12 と PND19 の間に形成されたと考えられた。嚢胞状集合管の上皮には細胞増殖を示す高密度の核分布や核分裂像及び高い PCNA 陽性率がみられたこと、そして、PCP の投与を中止すると、これらの細胞増殖活性が消失することから、PCP 投与が髄質外帯に分布する集合管上皮の増殖を活性化する可能性が示され、嚢胞の形成に細胞増殖の関与が考えられた。さらに、傷害性変化が先行せず、正常の集合管構造を逸脱する嚢胞状集合管の形態学的特徴から、PCP が局所でミトジェンとして働き、特定の集合管の一部に複製性増殖を惹起したものと推測された。

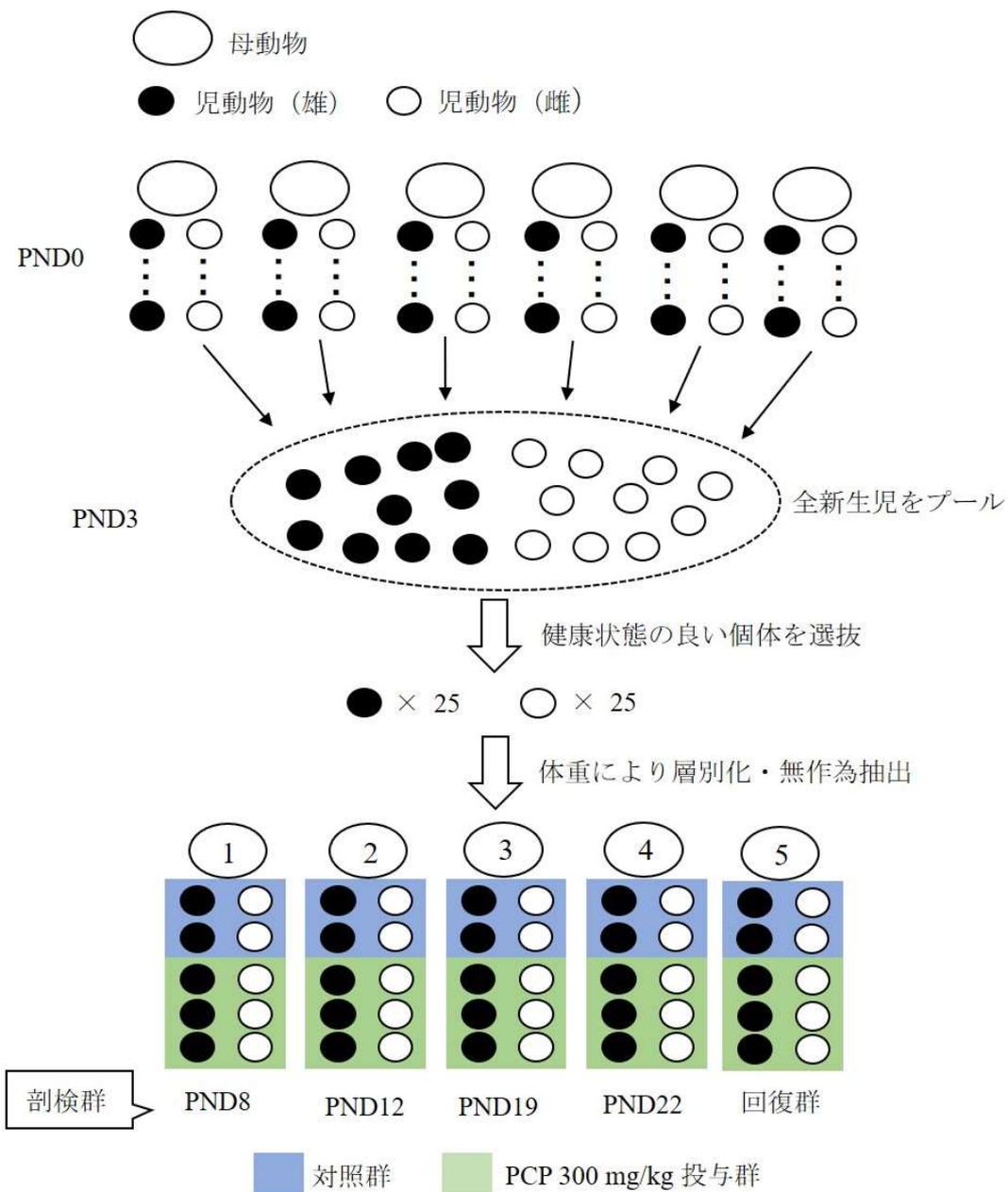


Fig. 6 反復経口投与試験 群構成方法

新生児の出生日を postnatal day (PND) 0 と規定した。PND3 に全ての新生児の中から健康状態の良い個体を雌雄 25 匹ずつ選抜し、雌雄ごとに体重に基づいて層別化し、無作為抽出法により 1 母動物が哺育する新生児の平均体重がほぼ均等となるように母動物 1 匹あたり雄 5 匹及び雌 5 匹の新生児を割り当て、哺育させた。

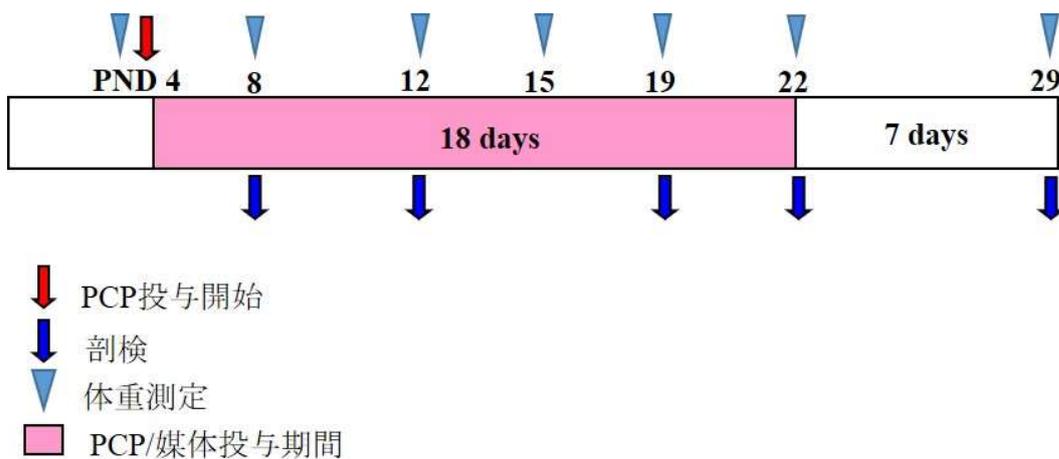


Fig. 7 PCP 反復経口投与試験 試験デザイン

PND=生後日齢 postnatal day、PND4 から 4、8、15 及び 18 日間にわたり PCP を経口投与した。それぞれを剖検時の日齢から PND8、12、19 及び 22 剖検群とした。さらに 18 日間投与後に一週間の休薬期間をおく回復群を設けた。各群は投与期間及び休薬期間終了の翌日に剖検を実施した。

Table 4 PCP 反復経口投与試験 群構成

| 試験群        | 投与量<br>(mg/kg) | 濃度<br>(mg/mL) | 投与容量<br>(mL/kg) | 性 | PND8 剖検群 |           | PND12 剖検群 |           |
|------------|----------------|---------------|-----------------|---|----------|-----------|-----------|-----------|
|            |                |               |                 |   | 動物数      | 動物番号      | 動物数       | 動物番号      |
| 媒体<br>対照群  | 0              | 0             | 10              | 雄 | 2        | 1001、1002 | 2         | 1003、1004 |
|            |                |               |                 | 雌 | 2        | 1101、1102 | 2         | 1103、1104 |
| PCP<br>投与群 | 300            | 30            | 10              | 雄 | 3        | 2001～2003 | 3         | 2004～2006 |
|            |                |               |                 | 雌 | 3        | 2101～2103 | 3         | 2104～2106 |

| 試験群        | 投与量<br>(mg/kg) | 濃度<br>(mg/mL) | 投与容量<br>(mL/kg) | 性 | PND19 剖検群 |           | PND22 剖検群 |           |
|------------|----------------|---------------|-----------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
|            |                |               |                 |   | 動物数       | 動物番号      | 動物数       | 動物番号      |
| 媒体<br>対照群  | 0              | 0             | 10              | 雄 | 2         | 1005、1006 | 2         | 1007、1008 |
|            |                |               |                 | 雌 | 2         | 1105、1106 | 2         | 1107、1108 |
| PCP<br>投与群 | 300            | 30            | 10              | 雄 | 3         | 2007～2009 | 3         | 2010～2012 |
|            |                |               |                 | 雌 | 3         | 2107～2109 | 3         | 2110～2112 |

| 試験群        | 投与量<br>(mg/kg) | 濃度<br>(mg/mL) | 投与容量<br>(mL/kg) | 性 | 回復群 |           |
|------------|----------------|---------------|-----------------|---|-----|-----------|
|            |                |               |                 |   | 動物数 | 動物番号      |
| 媒体<br>対照群  | 0              | 0             | 10              | 雄 | 2   | 1009、1010 |
|            |                |               |                 | 雌 | 2   | 1109、1110 |
| PCP<br>投与群 | 300            | 30            | 10              | 雄 | 3   | 2013～2015 |
|            |                |               |                 | 雌 | 3   | 2113～2115 |

反復経口投与試験の新生児の振り分けを示す。

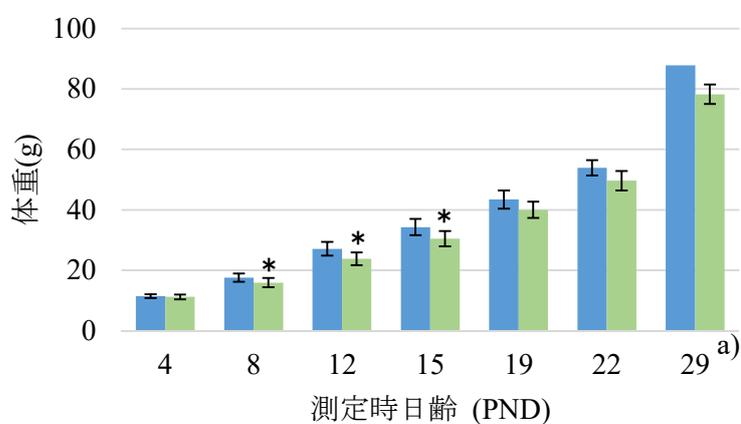
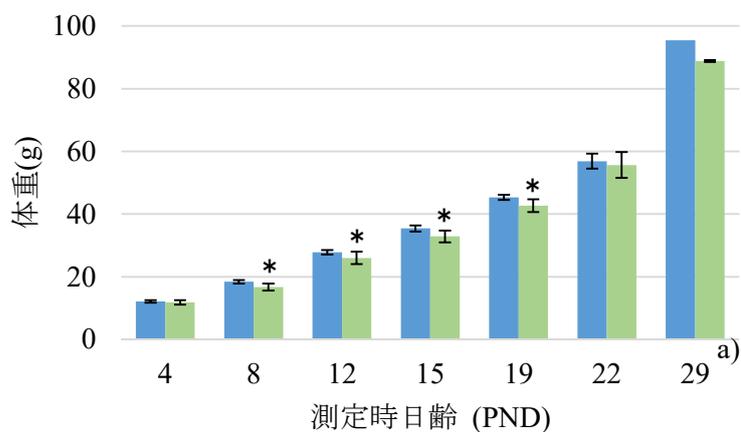
表中の動物番号は 1000 の位が群（対照群 1、PCP 300 mg/kg 投与群 2）、100 の位が性（雄 0、雌 1）、10 と 1 の位は個体番号とした。

Table 5 抗 PCNA 抗体免疫組織化学染色手順

|    | 染色手順            | 試薬・試液（製造元）  | 処理時間（条件）       |
|----|-----------------|---|----------------|
| 1  | 脱パラ、水和、水洗       |   |                |
| 2  | 膠原賦活化処理         | クエン酸緩衝液（pH6.0）  | Micro Wave・10分 |
| 3  | 室温冷却            |   |                |
| 4  | 内因性ペルオキシダーゼ活性阻害 | 0.3%過酸化水素水加メタノール  | 10分            |
| 5  | PBS 洗淨          |   |                |
| 6  | ブロッキング          | Protein Block（Dako）   | 10分            |
| 7  | 一次抗体            | Proliferating Cell Nuclear Antigen<br>[M0879]<br>（Dako）<br>希釈倍率：x 200 | 4℃、一晚          |
| 8  | PBS 洗淨          |   |                |
| 9  | 二次抗体            | LSAB2 キット/HRP<br>（Dako）   | 10分            |
| 10 | PBS 洗淨          |   |                |
| 11 | 酵素標識ストレプトアビジン   | LSAB2 キット/HRP<br>（Dako）   | 10分            |
| 12 | PBS 洗淨          |   |                |
| 13 | 発色              | DAB 錠<br>（富士フイルム和光純薬）   | 1分30秒          |
| 14 | 核染              | マイヤー・ヘマトキシリン<br>（武藤化学）  | 10秒            |
| 15 | 水洗、色出し          |   |                |
| 16 | 脱水、透徹、封入        |   |                |

抗 PCNA 抗体の染色手順を示す。

特に記載のない場合は常温で操作した。



| サンプル数     | 4  | 8  | 12 | 15 | 19 | 22 | 29 |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|
| 対照群       | 10 | 10 | 8  | 6  | 6  | 4  | 2  |
| 300 mg/kg | 15 | 15 | 12 | 9  | 9  | 6  | 3  |

Fig. 8 PCP 反復経口投与試験 体重

X 軸に測定時日齢 (PND=生後日齢 postnatal day) を、Y 軸に各群の体重の平均値 (g) 及び標準偏差 (エラーバー) を示す。

■ : 対照群、■ : 300 mg/kg 投与群

\* : 対照群との比較で有意差あり (t 検定、 $p < 0.05$ )

a) : 統計解析を実施せず。

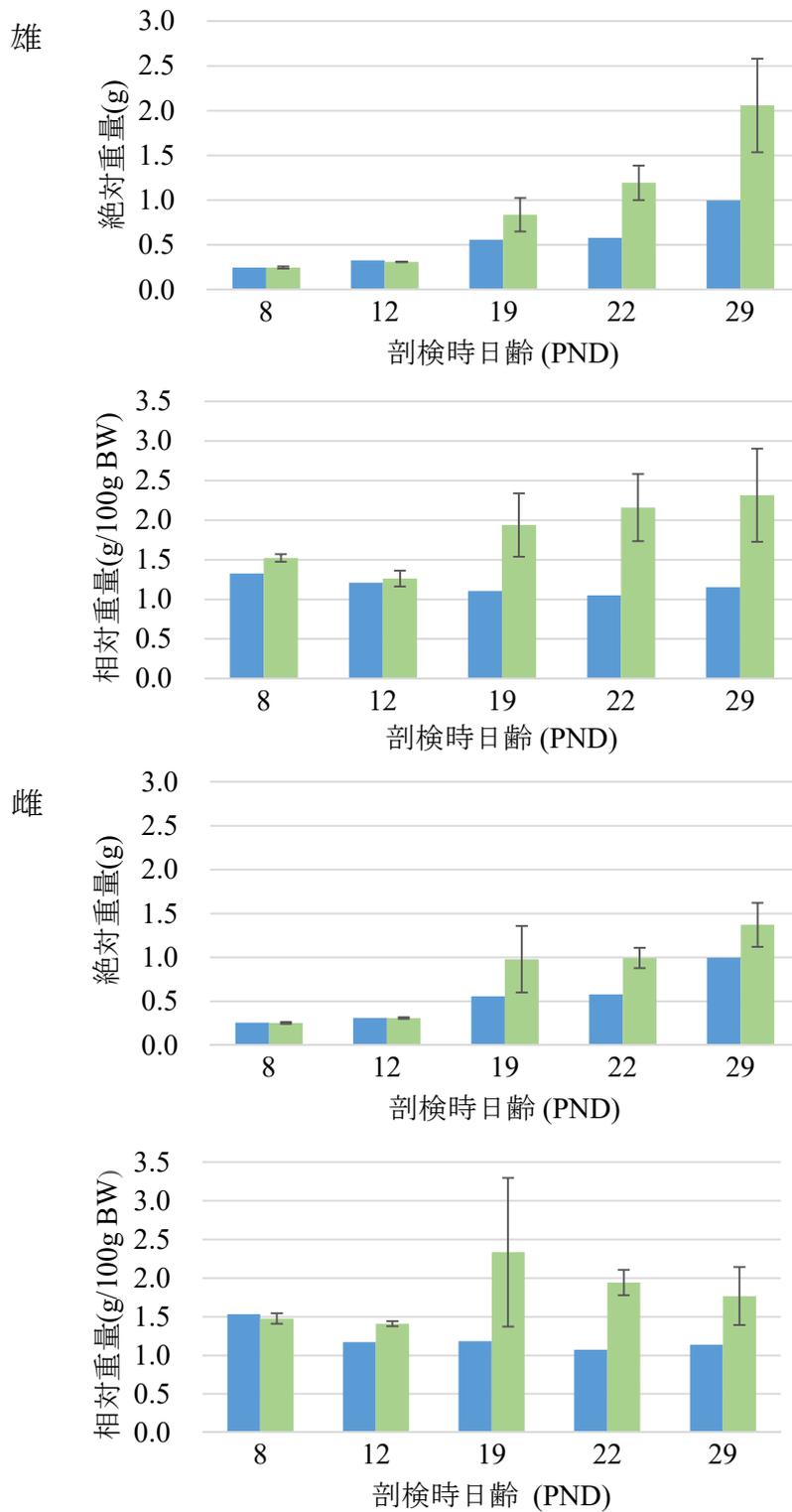


Fig. 9 PCP 反復経口投与試験 腎臓重量

X 軸に剖検時日齢 (PND=生後日齢 postnatal day) を、Y 軸に各群の腎臓重量 (絶対・相対) の平均値及び標準偏差 (エラーバー) を示す。

■ : 対照群 (n=2) 、 ■ : 300 mg/kg 投与群 (n=3)

Table 6 PCP 反復経口投与試験 病理組織学検査総括 (PCP 投与群)

|         |                       | 雄        |       |       |       |       |
|---------|-----------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
|         |                       | 投与終了時剖検群 |       |       |       | 回復群   |
| 剖検時日齢 : |                       | 8        | 12    | 19    | 22    | 29    |
| 動物数 :   |                       | 3        | 3     | 3     | 3     | 3     |
| 髄質外帯    | 集合管の嚢胞状拡張             | -        | -     | +++‡  | +++‡  | ++    |
|         | 集合管の拡張                | -        | -     | ±, +† | ±, +† | -, ±  |
|         | 管腔の細胞残渣 <sup>a)</sup> | -        | -     | ±     | -, ±  | ±     |
|         | 好中球浸潤 <sup>b)</sup>   | -        | -     | ±     | -, ±  | ±     |
| 髄質内帯基部  | 集合管の拡張                | -, ±     | -, ±  | ±†    | ±†    | -, ±  |
| 腎乳頭先端部  | 乳頭管の拡張                | -        | -     | ±, +  | ±, +  | ±, +  |
|         | 壊死                    | -        | -     | -     | -     | -     |
|         | 好中球浸潤                 | -, ±     | -     | -     | -     | -     |
| 皮質      | 好塩基性尿細管               | -        | -     | -     | -     | +     |
|         | リンパ球浸潤                | -        | -     | -     | -     | ±, +  |
|         |                       | 雌        |       |       |       |       |
|         |                       | 投与終了時剖検群 |       |       |       | 回復群   |
| 剖検時日齢 : |                       | 8        | 12    | 19    | 22    | 29    |
| 動物数 :   |                       | 3        | 3     | 3     | 3     | 3     |
| 髄質外帯    | 集合管の嚢胞状拡張             | -        | -     | +++‡  | +++‡  | +, ++ |
|         | 集合管の拡張                | -, ±     | -     | ±, +† | ±, +† | -, ±  |
|         | 管腔の細胞残渣 <sup>a)</sup> | -        | -     | -, ±  | -, ±  | -, ±  |
|         | 好中球浸潤 <sup>b)</sup>   | -        | -     | -, ±  | -, ±  | -, ±  |
| 髄質内帯基部  | 集合管の拡張                | ±†       | -, ±† | ±, +† | ±, +† | -, ±  |
| 腎乳頭先端部  | 乳頭管の拡張                | -        | -     | ±, +  | +     | ±, +  |
|         | 壊死                    | -        | -, ±  | -     | -     | -     |
|         | 好中球浸潤                 | -, ±     | -, ±  | -     | -     | -     |
| 皮質      | 好塩基性尿細管               | -        | -     | -     | -     | -, ±  |
|         | リンパ球浸潤                | -        | -     | -     | -     | ±     |

- : 変化なし、± : 軽微、+ : 軽度、++ : 中等度 観察されているグレードを記載した。

† : 軽微に過形成を呈する上皮が内張りする

‡ : 軽微または中等度に過形成を呈する上皮が内張りする

a) : 嚢胞状拡張集合管腔

b) : 嚢胞状拡張集合管周囲

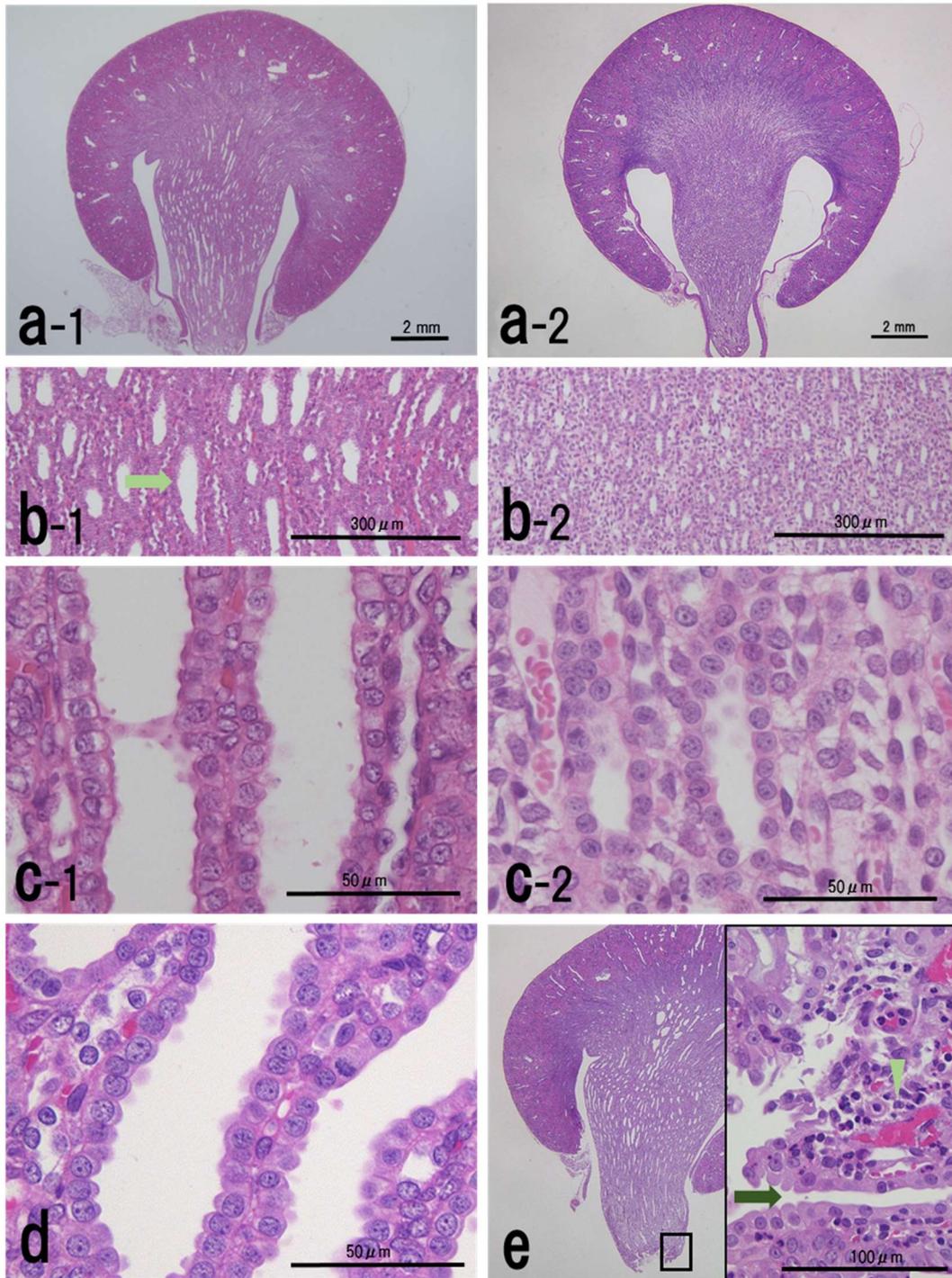


Fig. 10 PCP 反復経口投与試験 病理組織学検査 (PND12 剖検群)

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 (a) (a-1 : PCP 投与群、a-2 : 媒体対照群) (b) a の髓質内帯基部拡大像 (b-1 : PCP 投与群、 $\rightarrow$  : 尿細管の拡張、b-2 : 媒体対照群) (c) b の拡大像 (c-1 : PCP 投与群、尿細管の拡張、c-2 : 媒体対照群) (d) PCP 投与群 髓質内帯・上皮の核密度の増加を伴う集合管の拡張を示した雌の一例 (e) PCP 投与群 腎乳頭先端部の壊死及び壊死部拡大像 ( $\blacktriangledown$  : 好中球浸潤、 $\rightarrow$  : 上皮の反応性過形成)

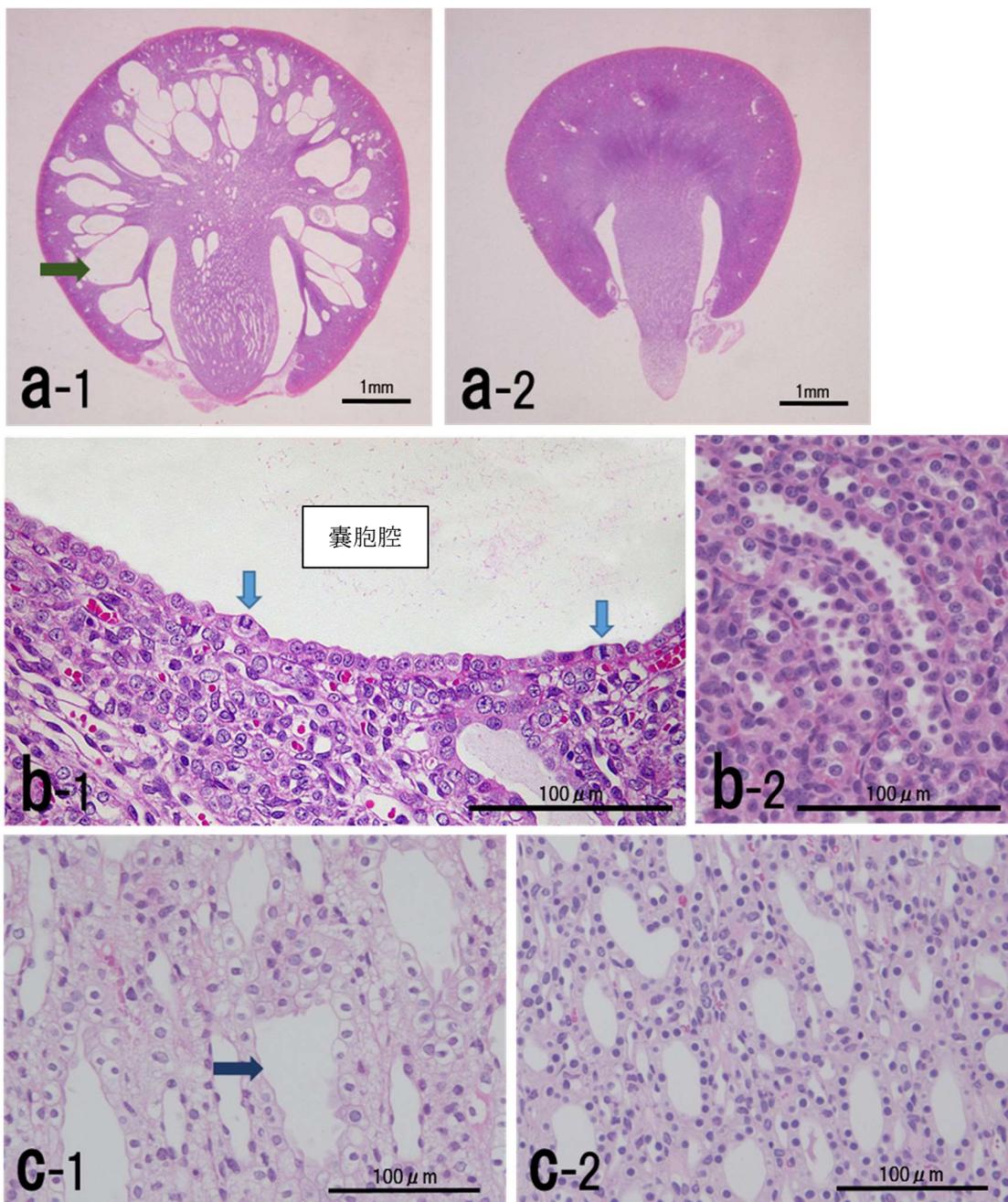


Fig. 11 PCP 反復経口投与試験 病理組織学検査 (PND22 剖検群)

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 (a) (a-1: PCP 投与群、 $\rightarrow$ : 集合管の嚢胞状拡張 (嚢胞)、a-2: 媒体対照群) (b) a の髄質外帯拡大像 (b-1: PCP 投与群、嚢胞の拡大像、 $\downarrow$ : 核分裂像、b-2: 媒体対照群) (c) a の腎乳頭先端部拡大像 (c-1: PCP 投与群、 $\rightarrow$ : 乳頭管の拡張、c-2: 媒体対照群)

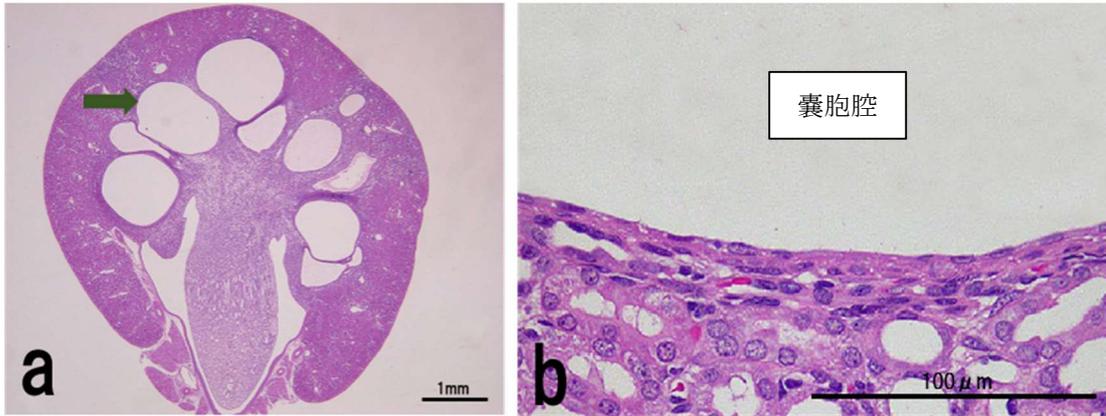


Fig. 12 PCP 反復経口投与試験 病理組織学検査 (回復群)

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 (a) PCP 投与群 → : 集合管の囊胞状拡張 (囊胞)

(b) 囊胞の拡大像

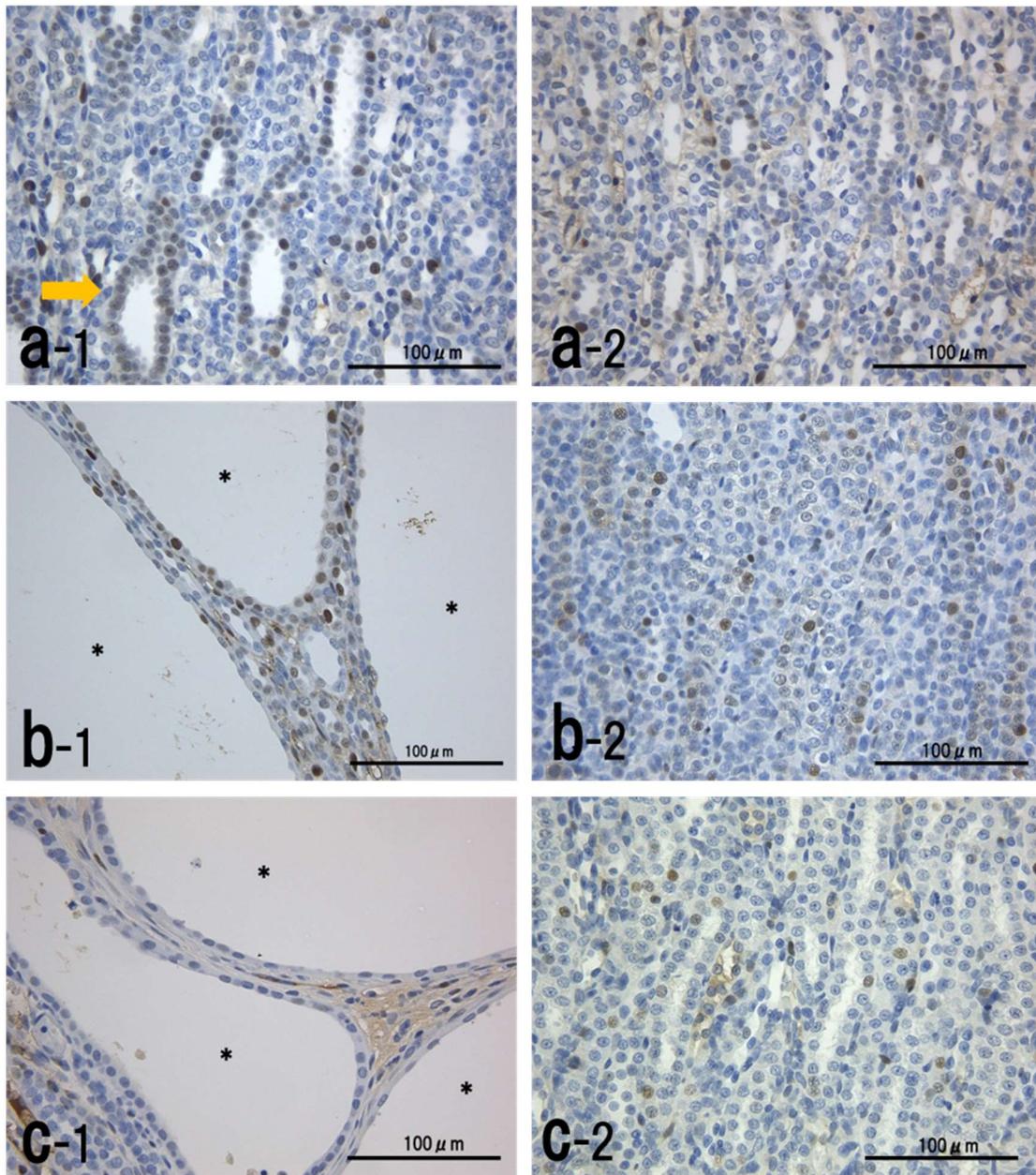


Fig. 13 PCP 反復経口投与試験 抗 PCNA 抗体による免疫組織化学染色

抗 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)抗体染色（茶色：陽性） (a)PND12 剖検群 髄質内帯 (a-1：PCP 投与群 →：集合管の拡張、a-2：媒体対照群) (b)PND19 剖検群 髄質外帯 (b-1：PCP 投与群、嚢胞、b-2：媒体対照群) (c) 回復群 髄質外帯 (c-1：PCP 投与群、嚢胞、c-2：媒体対照群)

\*：嚢胞腔

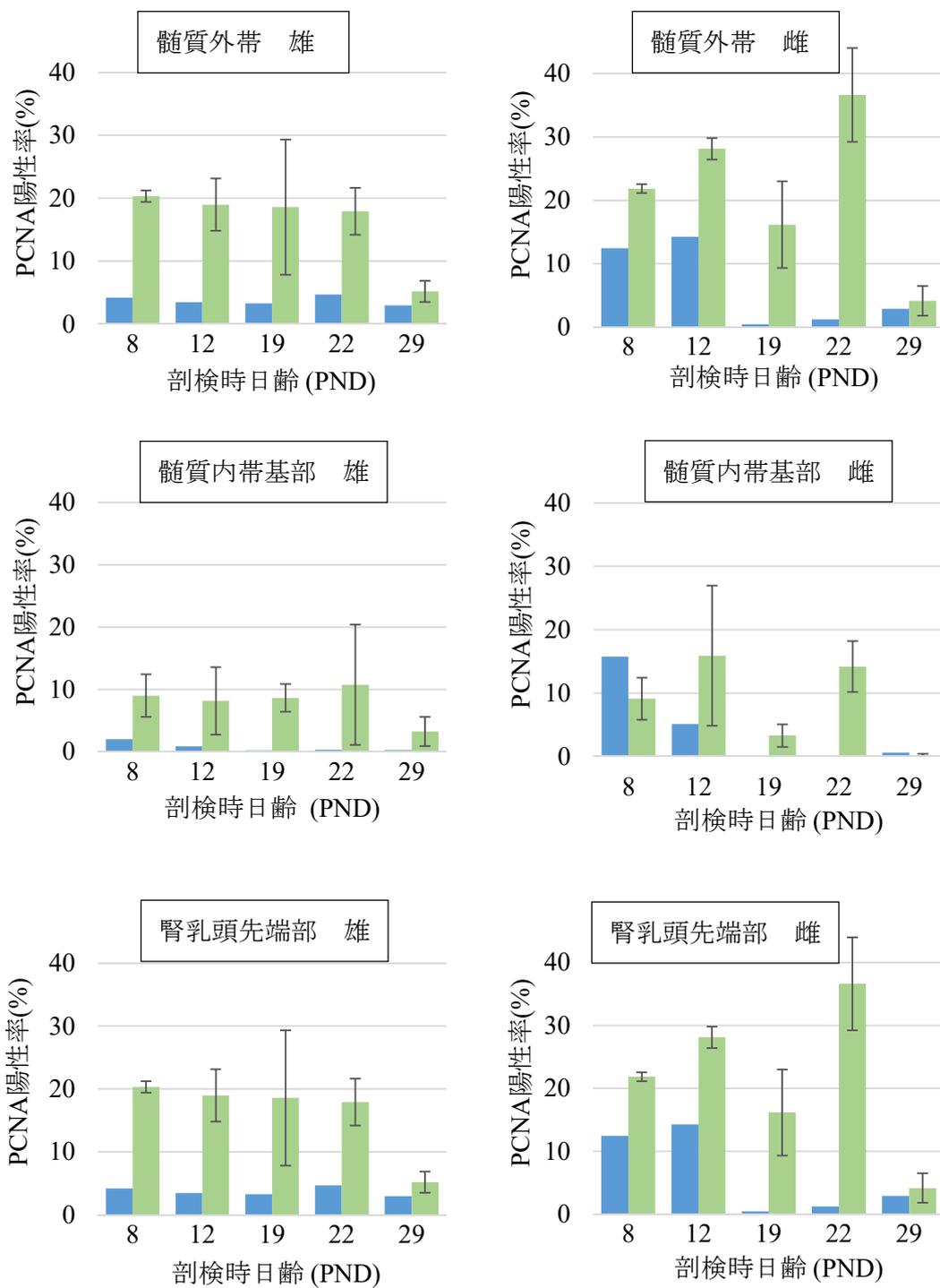


Fig. 14 PCP 反復経口投与試験 PCNA 陽性率

X 軸に剖検時日齡 (PND=生後日齡 postnatal day) を、Y 軸に各群の PCNA 陽性率の平均値 (%) 及び標準偏差 (エラーバー) を示す。

■ : 対照群 (n=2) 、 ■ : 300 mg/kg 投与群 (n=3)

## 第三章

### 投与臨界期検討試験

### 3.1 序論

発生途中にある腎臓は化学物質などの外来物質に対して一般的には感受性が高いと言われている。また、成熟した腎臓とは傷害の程度が異なるだけでなく、その発生段階によって外来物質に対する反応が異なるため傷害像が多様化している。したがって、腎臓の病変、特に出生後の新生児に観察される病変に関してその病理発生を考える際には腎臓の発生時期を考慮する必要がある (Frazier KS 2017)。また、腎臓の発生・成熟は動物種によってその時期に大きな違いがあることが知られており (Bueters R *et al.* 2020)、ラットでは出生前後が生体外物質に最も影響を受けやすい時期とされている (Seely JC 2017)。

腎臓の発生は大きく3つの段階から成り、それぞれ「前腎」「中腎」「後腎」と呼ばれる (Frazier KS 2017)。ヒトにおける腎臓の発生は腎機能を有しない前腎が妊娠週齢 (gestational week: GW) 3 に形成されることに始まり、前腎が GW5 に退縮するとともに中腎の形成・退縮が GW3-12 に起こる。その後、GW5 より原始尿管芽と呼ばれる上皮組織とその遠位端周囲に群がる間葉系細胞が上皮細胞に転換するという共同作業で後腎が形成される (Iino N *et al.* 2001)。今回の PCP を被験物質とした試験で病変の標的となっている集合管は後腎の原始尿管芽の分岐から発生する (Lindström NO *et al.* 2018)。このようにヒトにおける腎形態発生は胎生期に行われ、ネフロンの総数が決定される出生前の GW34 に完了する。その後、尿細管の伸長などを主とする腎臓の成長が出生後週齢 (postnatal week) 52 まで継続する (Frazier KS 2017)。

一方、ラットにおける「前腎」「中腎」「後腎」はそれぞれ妊娠日齢 (gestational day: GD) 5-12、GD12-17、GD14-28 に形成されるが、ヒトとは異なり形態発生は出生後も引き続いて起こり、腎臓の形態発生が完了するのは PND15 とされている (Zoetis T and Hurtt ME 2003)。そして、尿細管の伸長などを主とする腎臓の成長は

PND21 まで続く (Bueters R *et al.* 2020)。また、今回の PCP を被験物質とした試験で集合管が嚢胞を形成する主な領域である髄質外帯は、新生児期にみられる太いヘンレの上行脚がアポトーシスにより細いヘンレの上行脚に形態変化することで髄質内帯とは PND21 までに明瞭に区分されるように発達する (Schwartz GJ *et al.* 1999)。

このようにヒトとラットでは腎臓の発生時期に違いがあることから、若齢のヒトを治療対象とする新薬の開発に際して必要となる安全性試験では、ヒトとラットの相対的発生時期を念頭においた試験計画を立案することが求められている (Food and Drug Administration: FDA online 2006)。

PCP を新生児ラットに投与すると集合管が髄質外帯で多発性に嚢胞化することを第二章で述べた。第二章の試験では PCP を新生児ラットに PND4 から 18 日間にわたり投与したが、成獣ラットへの PCP 投与ではこのような嚢胞状の病変は形成されない (Hasegawa R *et al.* 2005)。また、新生児ラットで PND19 以降に集合管が嚢胞を形成する髄質外帯には PND12 までにいずれの病変も観察されていない。これらの結果から、PCP 投与によって新生児ラットに生じる集合管嚢胞は、新生児ラットに特有の病変であり、その病変は PND12 と PND19 の間に発生すると結論付けることが出来る。つまり、新生児から成獣へ成長するいずれかの時期に PCP による嚢胞腎が誘発される臨界期がある可能性が考えられた。ラットの腎形態発生は出生後も PND15 まで続くこと、生体外物質の影響は発生ステージで異なること、あるいは PCP により誘発される嚢胞の発生部位である髄質外帯が髄質内帯と明瞭に区分されるのは PND21 であることを考慮すると、PND4-22 の期間内にその臨界期があるものと推測される。これらの背景から第三章では、この臨界期の有無を検討する目的で次の試験を実施した。第二章で実施した試験で、新生児の嚢胞腎の形成には雌雄で大きな差が認められなかったが、PCNA 陽性率が雌では対照群から変動が大きい傾向があったことから、第三章の試験では雄を対象とした。さらに PCP で誘発され

る嚢胞腎について病理組織学的または免疫組織化学的に詳細な検討を実施した。まず、亜連続標本を観察し、嚢胞構造の解析及び周囲組織との関連性について検討した。また、第二章では H・E 染色標本の形態学的特徴に基づいて、髄質外帯に生じた嚢胞を集合管としたが、第三章では、集合管であることのさらなる確証を得るために、集合管の主細胞と結合尿細管に発現しており、集合管組織であることの検証に用いられているアクアポリン 2 (AQP2) (Rojek A *et al.* 2006) の免疫組織化学染色標本を用いて評価した。さらに AQP2 はヒトの常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) との関与が示唆されていることから (松崎利行 2009)、様々な日齢の無処置ラットの腎臓を用いて発現状況を検討した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 動物及び飼育環境

妊娠した 4 匹の Cri:CD(SD) 系ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の動物実験室で自然分娩させ、雄の新生児 46 匹を得た。個体識別のために母動物は入荷時に動物の尾にマーキングを施した。試験日を表すにあたり、新生児の出生日を PND0 と規定した。PND7 に全ての雄新生児から健康状態のよい個体を 20 匹選抜した（第 1 回群構成）。次に、これら新生児を同日の体重により層別化し、各群の平均体重がほぼ均等となるように無作為抽出法により W2 及び W3 の 2 群を構成した（W2、W3 及び後述の W4-6 の詳細については「3.2.3 試験群及び被験化学物質の投与」参照）。この 2 群を哺育する 2 匹の母動物を選択し、それぞれの母動物に媒体投与動物 2 匹、PCP 投与動物 3 匹、哺育匹数調整用動物 5 匹の計 10 匹を哺育させた。残りの母動物には残りの雄の新生児を 13 匹ずつ均等に割り付けた。PND21 に全ての新生児を離乳させ、哺育数調整動物及び残りの雄の新生児を当日の体重により層別化し、各群の平均体重がほぼ均等となるように W4、W5、W6 の群構成を実施した（第 2 回群構成）（Fig. 15）。

動物の飼育環境及び餌・水については第一章の PCP 単回経口投与試験と同様に実施した。

### 3.2.2 被験化学物質の調整

被験化学物質の調整法ならびに保管条件は第一章の PCP 単回経口投与試験に準じて実施した。

### 3.2.3 試験群及び被験化学物質の投与

第二章で述べた試験から、新生児ラットへの PCP の投与によって腎臓の髄質外

帯に多発性の集合管の嚢胞が PND12 以降に発生することが見出された。そこで、第三章の試験では、ラットの腎臓の発生が出生後も続くことを考慮し、新生児ラットの離乳期であり、腎臓の発生過程で髄質外帯が髄質内帯と明瞭に区分される PND21 を起点として (Schwartz GJ *et al.* 1999)、そこから 7 日間遡って投与を開始する群をまず設けた。次いで、PND22 には同様の嚢胞が認められたことから、離乳後の PCP 投与の影響を検討するために PND21 より 7 日間の間隔を置いて投与を開始する群を置いた。これらの投与開始時期が異なる複数の試験群にそれぞれ PCP を一定期間投与する分節型投与実験系によって、PCP が新生児ラットに嚢胞腎を惹起する臨界期を検討する試験を企画した。すなわち、第三章の試験には PND14-28 (W2 群)、21-35 (W3 群)、28-42 (W4 群)、35-49 (W5 群) 及び 42-56 (W6 群) に反復経口投与する 5 群を設定した (Fig. 16)。PCP の投与量は第二章と同じく 300 mg/kg/日とし、各群で PCP を 3 匹、媒体を 2 匹にそれぞれ反復経口投与した。群構成表を Table 7 に示した。群分け後の新生児は、性別及び群ごとに 4 桁の動物番号をつけ識別した。動物番号の付け方は、1000 の位が群 (媒体対照群 1、PCP 投与群 2)、100 の位が性 (雄 0)、10 と 1 の位は個体番号とした。また群分け後の新生児は尾へのマーキングにより個体識別を行った。

投与容量はこれまでの試験と同じく 10 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。個体ごとの投与液量は 1、4、8、11 及び 14 回投与前に体重を測定し、直近の測定日の体重を基準に算出した。哺育期間中の投与は母動物単位で行い、離乳後は群単位で行った。

観察期間中は全新生児について、外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察し、母動物については哺育状態を観察した。

### 3.2.4 剖検

W2-6 各群の投与期間終了翌日に剖検した。剖検時には体重を測定後、新生児をイソフルラン吸入麻酔下（株式会社バイオマシナリー、千葉）で腹大動脈切断による放血によって安楽死させ、外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行った。次いで、両側の腎臓を採取し、器官重量を測定した後、左側腎臓は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定・保存した。右側の腎臓については本研究では使用していないが、分子生物学的解析を実施する目的で液体窒素により凍結し、保存した。

### 3.2.5 病理標本作製

剖検に供した全ての新生児の左側腎臓について常法に従いパラフィン包埋を実施し、H・E 染色標本作製した。また、W2 群の 1 例及び第二章で得られた PND4 から 15 日間 PCP を反復経口投与した PND19 剖検群の 1 例の腎臓のパラフィンブロックから約 10  $\mu\text{m}$  毎の亜連続薄切標本作製して H・E 染色を施した。

さらに、今回の試験で得られた W2 群の 1 例の腎臓について、嚢胞化した尿細管を対象に抗アクアポリン 2 (AQP2) ウサギポリクローナル抗体を用い、ポリマー法により免疫組織化学染色を行った。陽性対照には 10 週齢の成獣ラットの正常腎臓を使用した。また PND4、7、14、21、28 及び 35 に剖検した無処置動物の腎臓についても同様に AQP2 による免疫組織化学染色を実施した。

#### 3.2.5.1 ヘマトキシリン・エオジン染色

PCP の単回経口投与試験で用いた方法に準じて実施した。

#### 3.2.5.2 免疫組織化学染色

染色手順を Table 8 に示した。

## 【主な試薬】

- Aquaporin 2 (Collecting Duct) (AQP2) Rabbit anti-Rat Polyclonal (pSer261) Antibody (LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, WA, USA)
- Signal Stain® Boost IHC Det. (HRP. Rab) (Cell signaling, Massachusetts, MA, USA)
- DAB 錠 (富士フイルム和光純薬)
- マイヤー・ヘマトキシリン染色液 (武藤化学株式会社)

### 3.2.6 病理組織学検査

#### 3.2.6.1 ヘマトキシリン・エオジン染色標本

全ての腎臓の H・E 染色標本を光学顕微鏡下で観察した。腎臓を成獣ラットの組織学的分類 (Khan KNM and Alden CL 2002) に従って、皮質、髄質外帯、髄質内帯、腎乳頭部に分けて観察し、グレードは著変なし (0)、軽微 (1)、軽度 (2)、中等度 (3)、高度 (4) の 5 段階評価とし、各群のグレードの平均値を算出した。なおグレード基準については PCP の単回経口投与試験に用いた基準に準じて実施した。

亜連続薄切標本を用いて嚢胞状集合管が正常の集合管と連続性を維持しているのか、あるいは盲管となって独立して存在しているのか、さらに閉塞性の病変があるかを検証するために鏡検評価した。

#### 3.2.6.2 抗 AQP2 抗体を用いた免疫組織化学染色

集合管の組織マーカーである AQP2 (Rojek A *et al.* 2006) の抗体による免疫組織化学染色標本について光学顕微鏡下で詳細な観察を実施した。

#### 3.2.6.3 統計学的処理

体重及び器官重量 (絶対及び相対重量) は平均値±標準偏差 (SD) で示した。ただし、サンプル数が 2 以下である項目については平均値のみを示した。

統計解析については媒体対照群のサンプル数が 2 であるため、実施しなかった。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 体重及び器官重量

体重は W2 群、W3 群及び W5 群で媒体対照群と比較して PCP 投与群で低値傾向がみられたが、一般状態の悪化を疑うような変動はみられなかった (Fig. 17)。

腎臓の重量については W2 群で絶対及び相対重量ともに高値傾向を示した (Fig. 18)。

#### 3.3.2 剖検

W2 群で軽度～中等度の大型化及び多発性の嚢胞が肉眼的にみられた (Fig. 19)。

#### 3.3.3 病理組織学検査

##### 3.3.3.1 ヘマトキシリン・エオジン染色標本

H・E 染色標本を用いた腎臓の組織学検査の結果の総括を Table 9 に、各群の代表例の低倍像を Fig. 20 に示した。

W2 群では髓質外帯に集合管が多数の嚢胞を形成していた。嚢胞腔の形態は主に髓質側が狭くなる楔型を呈していた。嚢胞を内張りする集合管上皮は核密度が高く、細胞の丈が高くなり、病理学的に過形成の像を示していた。そして、ごく少数の単細胞壊死が観察された他、細胞分裂像が散在性にみられた。しかし、過形成となった上皮細胞は基底膜に沿って一層に配列しており、管腔内への乳頭状突起形成あるいは局所的な多層化結節形成などの、増殖形態は認められなかった (Fig. 21 a-1)。一方、髓質内帯や腎乳頭部ではそれぞれ集合管及び乳頭管がわずかに拡張するにとどまっていた。

W3 群では髓質外帯の集合管に嚢胞形成が認められた。しかし、W2 群と比較して、形態的に嚢胞の数は減少するとともに嚢胞腔はより円形の形状を呈した。さら

に、上皮細胞の単細胞壊死及び分裂像が稀にみられたが、嚢胞を内張りする上皮は一部で扁平状となって過形成の像は消失した (Fig. 22 a)。髄質内帯及び腎乳頭部では集合管及び乳頭管に弱い拡張がみられた。

W4 及び W5 群では W2 群と対照的に、腎臓には嚢胞形成は全くみられなかった。

このように W4 及び W5 群では PCP 投与に起因する変化が消失したため、W6 群は病理組織学検査を実施しなかった。

亜連続に薄切した標本ではそれぞれ約 20 個の嚢胞がみられる切片を 98 枚及び 66 枚観察した。嚢胞は周囲組織を圧排することなく、また、周囲組織に細胞傷害を及ぼすこともなかった。また、嚢胞状集合管の管腔は、尿路の上流及び下流ともに、わずかに拡張した集合管に連続していた。つまり、厚さ約 3  $\mu\text{m}$  の病理標本上で嚢胞状を呈する組織は、独立した閉鎖系の球状盲管が発生したのではなく、正常の尿路である集合管が髄質外帯で部分的に限局性に拡張した結果生じた組織像であることが確認された。嚢胞化した集合管と正常の集合管の移行部には、内腔への上皮隆起や細胞残渣等の尿流路を閉塞する所見はみられなかった。一方、嚢胞状集合管の上流及び下流の集合管との移行部領域では、嚢胞状を呈していない集合管と比較して、隣接する核が隙間なく並んでおり、核の基底膜からの距離も不揃いで上皮の核密度が高くなっている様子が観察された (Fig. 23)。しかし、嚢胞状集合管の上皮は正常の単層構造を維持していた。

### 3.3.3.2 抗 AQP2 免疫組織化学染色

W2 群で生じた嚢胞は抗 AQP2 抗体に陽性を示した (Fig. 24 a)。また、AQP2 の発現分布について、新生児ラットの腎臓の嚢胞状集合管とその周囲の正常集合管で比較検討したが、両組織に大きな違いは見られなかった。さらに、上記 W2 群の嚢胞がみられた新生児ラットと剖検時同週齢 (PND28) の無処置動物の腎臓でも、W2

群の嚢胞状集合管と比較して正常集合管での AQP2 の発現分布に差はなかった (Fig. 24 b)。

加えて、PND4 から PND35 まで 6 ポイントの時期の PND4、7、14、21、28 及び 35 の無処置新生児ラット及び 10 週齢の成獣ラットの抗 AQP2 抗体による免疫組織化学染色標本を観察したところ、新生児ラットの腎臓における AQP2 は、PND4 からすでに成獣ラットと同様の発現分布を示し、PND35 でも分布に変動はみられなかった。したがって、新生児ラットの腎臓には AQP2 の発現分布に成獣ラットと比較して明らかな差はみられなかった (Fig. 24 c, d)。

### 3.4 考察

PCP を 300 mg/kg/日 で新生児ラットに投与した時に、腎臓の髄質外帯に生じる嚢胞の形成作用に投与臨界期があるかどうかを検討するために、ラットの腎臓の発生時期を考慮して PND14-28 (W2 群)、21-35 (W3 群)、28-42 (W4 群)、35-49 (W5 群) 及び 42-56 (W6 群) に反復経口投与する 5 群構成の試験を実施した。その結果、W2 群では髄質外帯全域にわたり広範囲かつ多発性に集合管の嚢胞状拡張が観察され、それら嚢胞の大きさは大小様々であり、ヒトに報告されている多発性嚢胞腎に類似した像を呈した。W3 群でも髄質外帯に嚢胞化した集合管が認められたが、その数は W2 群に比べて明らかに減少し、嚢胞腔の多くは円形状となった。また、W2 群に発生した嚢胞は円柱状の上皮で内張されていたが、W3 群では上皮は部分的に扁平化し、過形成の像は消失していたことから、PCP の細胞増殖活性を上昇させることで嚢胞状拡張を引き起こす作用は弱まっていることが示唆された。W4 及び W5 群には嚢胞は全く形成されず、このことより W6 群の病理組織学的評価は実施しなかった。

W3 群には PND21-35 の期間に反復投与したが、この群に観察された髄質外帯における集合管の嚢胞の組織像には、第二章で PCP 投与 18 日後に 1 週間の休薬期間を設けた回復群の組織像と多くの共通点がある。すなわち、第二章の回復群でも第三章の W3 群でも集合管の嚢胞状拡張の程度が各章の試験で最も強かった群の組織像と比べて、形態的に嚢胞の数が少なく、嚢胞腔が円形状を呈し、内張りする上皮が扁平であり分裂像が観察されなかった (Fig. 22)。このことは W3 群では W2 群と同様に髄質外帯で集合管が多発性に嚢胞化したものの、その投与期間の後半の 1 週間に当たる PND28-35 は第二章の休薬群と同等の状態にあり、髄質外帯において集合管を嚢胞化させる PCP の作用は消失していると考えられた。この仮説は PND28 から投与を開始した W4 群には、嚢胞化した集合管が形成されなかったことから

裏付けられた。

PCP の投与によって生じる髄質外帯における第三章で得られた知見と、第二章で得られた PND4-12 の投与期間では集合管嚢胞が形成されなかったという事実を投与期間に従ってまとめると以下のようになる。

PCP の投与期間が PND4-12 では、第二章の結果に示したように嚢胞状の集合管は観察されなかった。PND14-28 では第三章の W2 群でみられたように、集合管の高度な嚢胞状拡張（嚢胞）が観察された。PND21-35 では第三章の W3 群でみられたように、軽度な集合管の嚢胞状拡張（嚢胞）が観察され、第二章の回復群の組織像に類似していた。PND28 以降では第三章の W4 及び 5 群でみられたように嚢胞は観察されなかった (Fig. 25)。これらの結果より、新生児ラットに PCP を投与することで誘発される髄質外帯の集合管由来の多発性の嚢胞形成には投与臨界期が存在し、その投与臨界期は PND14-28 であるものと考えられた。

ラットの腎臓は生後も形態学的あるいは機能的な成長を続けている。その形態学的な分化は PND11-15 に至り、さらに尿細管は PND21 の離乳期まで伸長し、腎臓の髄質内帯と外帯が分離形成される (Zoetis T and Hurtt ME 2003)。腎臓の血管系は複雑であるが、その循環機能は PND16-24 で完成する (Bueters R *et al.* 2020)。また、腎糸球体のろ過機能と尿細管の分泌機能は PND21 までに分化する (Snodgrass WR 1992)。PCP が有する髄質外帯における集合管の嚢胞化作用を発揮する投与臨界期は、新生児ラット特有の腎臓の発生過程が深く関わっているものと考えられ、成長に伴い PND28 以降では PCP が集合管の嚢胞状拡張を引き起こす作用点が消失または変化したものと推測される。

亜連続標本を用いた鏡検評価により、PCP が新生児ラットに誘発する髄質外帯の嚢胞に新たな知見が得られた。1 枚の H・E 染色標本からは、集合管に由来すると考えられる嚢胞とその周囲の正常集合管との関係を明らかに出来なかったが、亜連

続標本によって、嚢胞は髄質外帯という特定の領域に分布する正常の集合管の一部の上皮の細胞数が増加し、その結果、集合管が部分的に嚢胞状に拡張した像であることが明らかとなった。このような解剖学的に領域限定的な病変が誘発されるためには、PCP の作用を受ける標的分子が該当部位に限定して発現している、または PCP が作用した結果、例えばバソプレシン V2 受容体などの細胞の増殖に関わる分子が該当部位のみで発現した可能性が考えられた (Torres VE *et al.* 2007)。

また、亜連続標本によって、髄質外帯の嚢胞形成には尿流路の閉塞病変は関与していないこと、そして、腫瘍病変への形質転換はないことも示唆され、第二章の考察をさらに支持するものであった。

AQP2 は水チャネルとして機能する膜タンパク質で、腎臓では結合尿細管及び皮質から髄質にかけて走行する集合管の主細胞に発現している (Rojek A *et al.* 2006)。PCP 投与により新生児ラットに生じる髄質外帯の多発性の嚢胞を形成する上皮は AQP2 陽性を示したことから、集合管由来であるものと判断された。

AQP2 は血中のバソプレシン濃度が低い時には細胞内の小胞により多く分布し、バソプレシンがバソプレシン V2 受容体に結合すると、細胞内の cAMP レベルが上昇し、AQP2 は細胞膜に輸送され、そこで水の再吸収の役割を担う (Takata K *et al.* 2008)。ヒトの常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) 及びいくつかの多発性嚢胞腎のモデル動物ではバソプレシン V2 受容体の発現量が増加しており、それに伴い AQP2 の発現量も増加していることから、多発性嚢胞腎形成に AQP2 の関与が疑われている (松崎利行 2009)。そこで、本実験で PCP に誘発された嚢胞腎の発生にも AQP2 が関与しているかどうかを検証するために、新生児ラットの異なる発生段階による腎臓の AQP2 の発現状況を評価した。PND4 から PND35 まで 6 ポイントの時期の新生児ラットと 10 週齢の成獣ラットの腎臓組織標本に抗 AQP2 抗体による免疫組織化学染色を施したところ、新生児の腎臓における AQP2 は、PND4 からす

でに成獣と同様の発現分布を示し、PND35でも分布に変動はみられなかった。したがって、新生児ラットの腎臓にはAQP2の発現分布に成獣と明らかな差はなく、また、髄質外帯で嚢胞を形成している集合管と周囲の正常集合管を比較してもAQP2の発現に違いは認められなかったことから、PCPが新生児ラットに誘発する嚢胞腎の形成とAQP2の関与を示すことはできなかった。

PND14-28という嚢胞が発生する投与臨界期が存在することは、PCPが有する髄質外帯での集合管の嚢胞化作用を発揮するために必要不可欠な分子がこの期間に限定的に発現していることを意味する。したがって、その分子あるいは分子群を特定できれば、PCPや類似構造を持つ化学物質の腎障害についての病理発生機序を解明できるものと考えられた。

モデル動物やヒトの多発性嚢胞腎の発生機序として、1) 上皮細胞の増殖および分化の異常、2) 尿細管基底膜成分および関連する細胞外マトリックスの変化、3) 主要な受容体および酵素の局在異常を伴う上皮細胞の極性の異常、4) 上皮からの液輸送の異常が複合して起こると言われている (Guay-Woodford LM 2003)。第二章の結果より、PCPによる嚢胞形成についても上皮細胞の増殖については関連があることが推測されている。ヒトでは腎臓の嚢胞性疾患として先天性の多発性嚢胞腎が知られており、常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) 及び常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD) が含まれる (香村衡一 2003)。ARPKDは小児の稀な疾患であり、集合管の拡張により多数の嚢胞状病変が形成される点でPCP誘発性の新生児ラットにおける嚢胞腎と類似している (Kaimori JY *et al.* 2017)。ARPKDはPKHD1遺伝子の異常であることが原因として解明されており、細胞骨格を制御するRhoAの働きが低下することで嚢胞が形成される (Kaimori JY *et al.* 2017)。2002年にはヒト、動物を問わず、嚢胞腎の原因遺伝子の遺伝子産物が上皮の繊毛機能に関わることが報告され、繊毛の異常により上皮細胞が極性を失い、増殖機転につながることで嚢胞

が発生するという繊毛病 (ciliopathy) の考え方が提唱された (Igarashi P and Somlo S 2002)。一方で、ADPKD では原因遺伝子 *PKD1* 及び *PKD2* が知られている (土谷 健 他 2017)。*PKD1* がコードするタンパク質 polycystin-1 は尿量を感知するセンサーであり、*PKD2* がコードするタンパク質 polycystin-2 はカルシウムチャネルである。この2つのタンパク質は繊毛に存在し、polycystin-1 が機械的受容体としてシグナルを polycystin-2 に伝達すると細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、尿細管の管径を調整する。この2つの遺伝子の異常により、ADPKD ではまず細胞内のカルシウム濃度の低下が起こり、引き続いて細胞内のホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase) 活性がカルシウム濃度に影響されて低下するため cAMP が増加する。cAMP は複数のシグナル伝達経路のセカンドメッセンジャーであり、cAMP の増加は体液分泌と細胞増殖を促進するため、尿細管の異常な増殖と共に尿細管からの分泌亢進が起こり、結果として嚢胞が形成されると言われている (Torres VE *et al.* 2007)。さらに ADPKD の嚢胞を形成する尿細管ではバソプレシン V2 受容体の発現が亢進していることが報告されている (Torres VE *et al.* 2007)。バソプレシン及びバソプレシン V2 受容体は、cAMP の合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ (adenyl cyclase) を活性化させることで cAMP の産生が増加し、この増加した cAMP が PKA (protein kinase K) を介して CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) により液体の管腔内への流入を促進して嚢胞の拡大をもたらすと同時に、mTOR (mammalian target of rapamycin) を介して細胞増殖を起こすと考えられている (Torres VE *et al.* 2007)。

また、PCP には *in vitro* で変異原性が報告されていることから (ECHA online 2005)、新生児ラットの尿細管 (集合管) 上皮の繊毛機能に関係する遺伝子に変異を来した可能性も否定できない。しかし、上記のヒトの先天性多発性嚢胞腎は遺伝性疾患であり、そのため腎病変は緩やかに進行していく。一方で、PCP により誘発される嚢胞腎は第二章で示したように休薬により回復する可逆性の変化である。よって、PCP

が *in vivo* で新生児ラットの上皮繊毛機能に関連する遺伝子に変異を引き起こして髄質外帯の集合管を嚢胞化したとは考え難い。

Muto ら (2002) の報告によると、PKD1 ノックアウトマウスは胎生致死性で心奇形や嚢胞腎を生じる (Muto S *et al.* 2002)。このマウスではペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : PPAR $\gamma$ ) の発現が低下し、腎臓では  $\beta$ -カテニン ( $\beta$ -catenin) 並びに E-カドヘリン (E-cadherin)、血小板内皮細胞接着分子 - 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1: PECAM-1) などの細胞接着因子が減少し、それに反して細胞増殖因子としての上皮成長因子 (Epithelial growth factor: EGF) 受容体の発現が上昇している (Muto S *et al.* 2002)。

第二章の考察にて記載したように、PCP はエストロゲン作用を有する可能性がある (Hasegawa R *et al.* 2005)。エストロゲンはエストロゲン受容体と細胞の増殖や成長を制御する EGF 受容体との相互作用によりそれぞれの働きを増強するので (Levin ER 2003)、エストロゲン作用が PCP による細胞増殖に関与している可能性がある。

PCP 誘発嚢胞腎でも上記のようなモデル動物またはヒトの嚢胞発生機序と同じことが起こっている可能性がある。よって、PCP の作用機序を検討するにあたり、1) 上皮細胞の増殖および分化の異常の解析として、細胞増殖因子としてのバソプレシン V2 受容体、エストロゲン受容体及び EGF 受容体の発現分布及び発現量の確認、2) 尿細管基底膜成分および関連する細胞外マトリックスの解析、3) 主要な受容体および酵素の局在異常を伴う上皮細胞の極性の異常の解析として、繊毛の超微細形態観察及び繊毛上分子の発現分布及び発現量の確認、4) 上皮からの液輸送の異常の解析として各種トランスポータータンパク質の発現量の確認を実施すべきと考える。

### 3.5 小括

第三章では、PCP が有する新生児ラットに嚢胞腎を発生させる作用を発揮するにあたり、その投与臨界期について検討した。実験には新生児ラットの PND14-28 (W2 群)、21-35 (W3 群)、28-42 (W4 群)、35-49 (W5 群) 及び 42-56 (W6 群) に反復経口投与する 5 群を設けた。その結果、PND14-28 投与 (W2 群) で髄質外帯に最も顕著な多発性の嚢胞が形成され、PND21-35 (W3 群) ではその程度が減弱し、PND28 (W4 群) 以降の投与では嚢胞形成は認められなかった。PND28 以降の投与では嚢胞が発生していなかったこと、及び PND21-35 投与と第二章の 1 週間休薬群にみられた組織像が類似していることから、PND21-35 投与の後半の 1 週間には PCP の嚢胞形成作用は消失しているものと推察された。さらに第二章の PND4-12 投与では嚢胞は形成されていないことを考え合わせ、PCP の新生児ラットに対する嚢胞腎誘発作用には PND14-28 が投与臨界期であると判断された。この投与臨界期には新生児ラット特有の腎臓の発生過程が深く関わっているものと考えられた。

また、本章では髄質外帯に嚢胞が形成された腎臓に集合管のマーカである AQP2 の免疫組織化学染色を施すとともに、亜連続標本作製して、嚢胞の全貌を詳細に鏡検した。観察結果から、発生した嚢胞は、AQP2 に陽性を示したことから、集合管由来であることが確認された。また、亜連続標本の観察により、嚢胞は髄質外帯に分布する正常の集合管の一部で管腔が局所的に拡張したものであり、開放的に上流及び下流の尿流路と連続していること、腫瘍性への形質転換は指摘できないこと、さらに、嚢胞発生に閉塞性病変の関与はないことが示された。また、AQP2 はヒトの多発性嚢胞腎形成との関与が言われていることから、PND4 から PND35 までの新生児ラットと成獣ラットで発現分布を比較したが、AQP2 の発現分布に週齢による差はみられず、PCP の投与により誘発される嚢胞形成と AQP2 の関連は結論できなかった。

PCP の投与臨界期が存在することは、PCP が有する髄質外帯での集合管の嚢胞状拡張作用を発揮するために必要不可欠な分子がこの期間に限定的に発現していることを意味する。したがって、その分子あるいは分子群を特定できれば、PCP や類似構造を持つ化学物質の腎障害についての病理発生機序を解明できるものと考えられた。病理発生機序解明のために今後、上皮細胞の細胞増殖因子の確認、尿細管基底膜成分および関連する細胞外マトリックスの解析、絨毛の超微細形態観察及び絨毛上分子の発現分布及び発現量の確認、各種トランスポータータンパク質の発現量の実施すべきと考える。

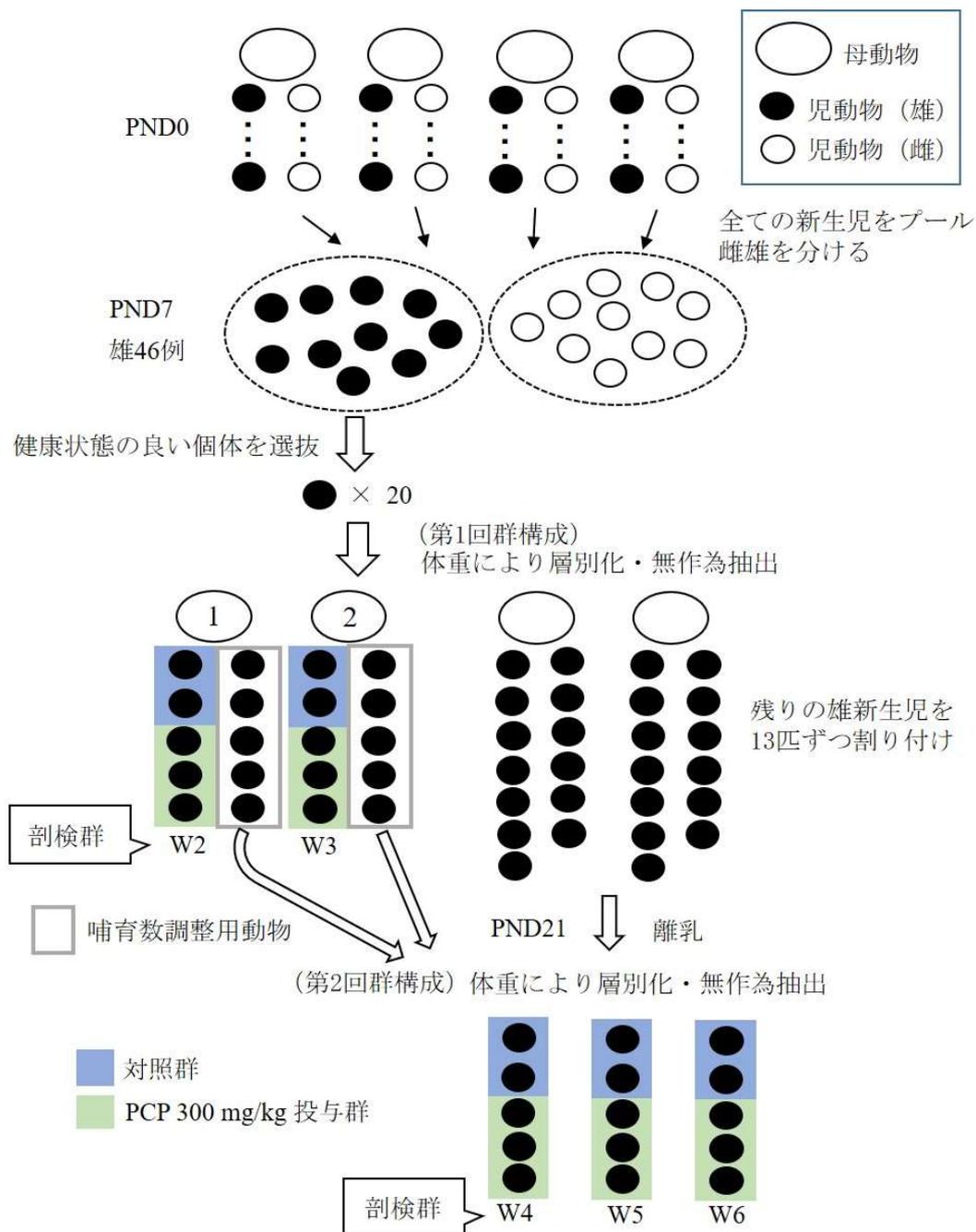


Fig. 15 投与臨界期検討試験 群分け方法

新生児の出生日を postnatal day (PND) 0 と規定した。PND7 に新生児を雌雄に分け、全ての雄新生児の中から健康状態の良い個体を 20 匹選抜し、体重に基づいて層別化し、無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均等となるように W2 及び W3 群を構成し、哺育数調整用動物と共に母動物に哺育させた。残りの雄新生児は母動物 2 匹に 13 匹ずつ哺育させた。離乳後 (PND21)、哺育数調整動物及び残りの雄新生児を再度体重に基づいて層別化し、無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均等となるように W4、W5 及び W6 群を構成した。

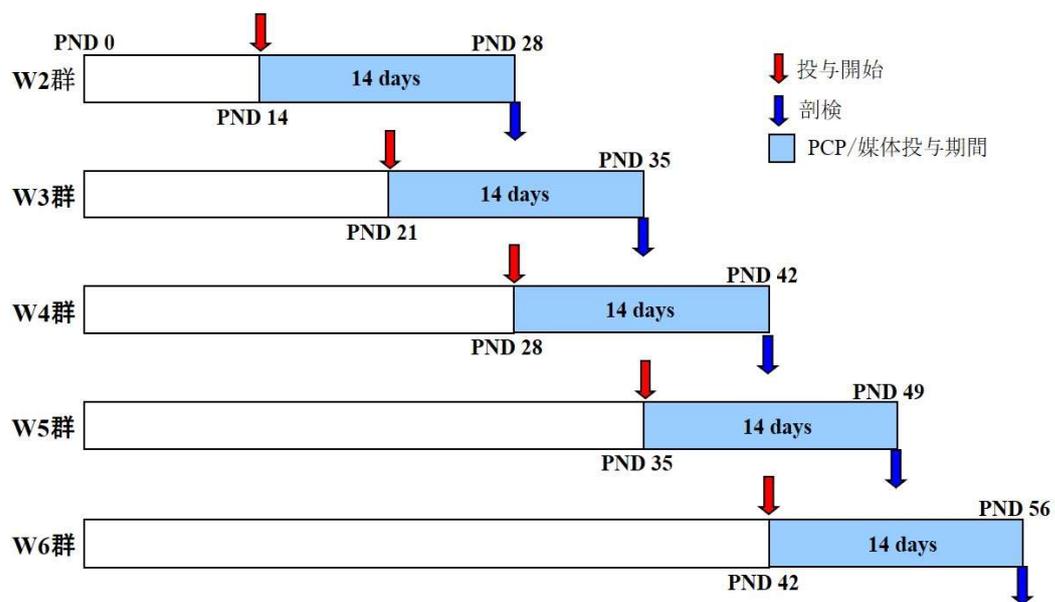


Fig. 16 投与臨界期検討試験 試験デザイン

PND=生後日齢 postnatal day、PND14-28 (W2群)、21-35 (W3群)、28-42 (W4群)、35-49 (W5群) 及び 42-56 (W6群) に反復投与する5群を設定し、PCPを300 mg/kgの用量で14日間反復経口投与し、投与終了の翌日に剖検した。

Table 7 投与臨界期検討試験 群構成

| 群           | 投与量<br>(mg/kg) | 濃度<br>(mg/mL) | 投与容量<br>(mL/kg) | 動物数 |   | 動物番号 |      |      |      |      |
|-------------|----------------|---------------|-----------------|-----|---|------|------|------|------|------|
|             |                |               |                 |     |   | 群名称  |      |      |      |      |
|             |                |               |                 |     |   | W2 群 | W3 群 | W4 群 | W5 群 | W6 群 |
| 対<br>照<br>群 | 0              | 0             | 10              | 雄   | 2 | 1001 | 1003 | 1005 | 1007 | 1009 |
|             |                |               |                 |     |   | 1002 | 1004 | 1006 | 1008 | 1010 |
| 投<br>与<br>群 | 300            | 30            | 10              | 雄   | 3 | 2001 | 2004 | 2007 | 2010 | 2013 |
|             |                |               |                 |     |   | 2002 | 2005 | 2008 | 2011 | 2014 |
|             |                |               |                 |     |   | 2003 | 2006 | 2009 | 2012 | 2015 |

投与臨界期検討試験における各群の新生児の振り分けを示す。

表中の動物番号は 1000 の位が群（対照群 1、PCP 300 mg/kg 投与群 2）、100 の位が性（雄 0）、10 と 1 の位は個体番号とした。

Table 8 抗 AQP2 抗体免疫組織化学染色手順

|    | 染色手順            | 試薬・試液（製造元）  | 処理時間（条件）       |
|----|-----------------|---|----------------|
| 1  | 脱パラ、水和、水洗       |   |                |
| 2  | 膠原賦活化処理         | クエン酸緩衝液（pH6.0）  | Micro Wave・10分 |
| 3  | 室温冷却            |   |                |
| 4  | 内因性ペルオキシダーゼ活性阻害 | 0.3%過酸化水素水加メタノール  | 10分            |
| 5  | PBS 洗淨          |   |                |
| 6  | ブロッキング          | Protein Block（Dako）   | 10分            |
| 7  | 一次抗体            | Aquaporin 2 (Collecting Duct) (AQP2)<br>Rabbit anti-Rat Polyclonal (pSer261)<br>Antibody（LifeSpan BioSciences Inc.）<br>希釈倍率：x 100 | 4℃、一晚          |
| 8  | PBS 洗淨          |   |                |
| 9  | ポリマー反応          | Signal Stain® Boost IHC Det.<br>[HRP. Rab]<br>(Cell signaling technology)   | 30分            |
| 10 | PBS 洗淨          |   |                |
| 11 | 発色              | DAB 錠<br>(富士フイルム和光純薬)   | 1分30秒          |
| 12 | 核染              | マイヤー・ヘマトキシリン<br>(武藤化学)  | 10秒            |
| 13 | 水洗、色出し          |   |                |
| 14 | 脱水、透徹、封入        |   |                |

抗 AQP2 抗体の染色手順を示す。

特に記載のない場合は常温で操作した。

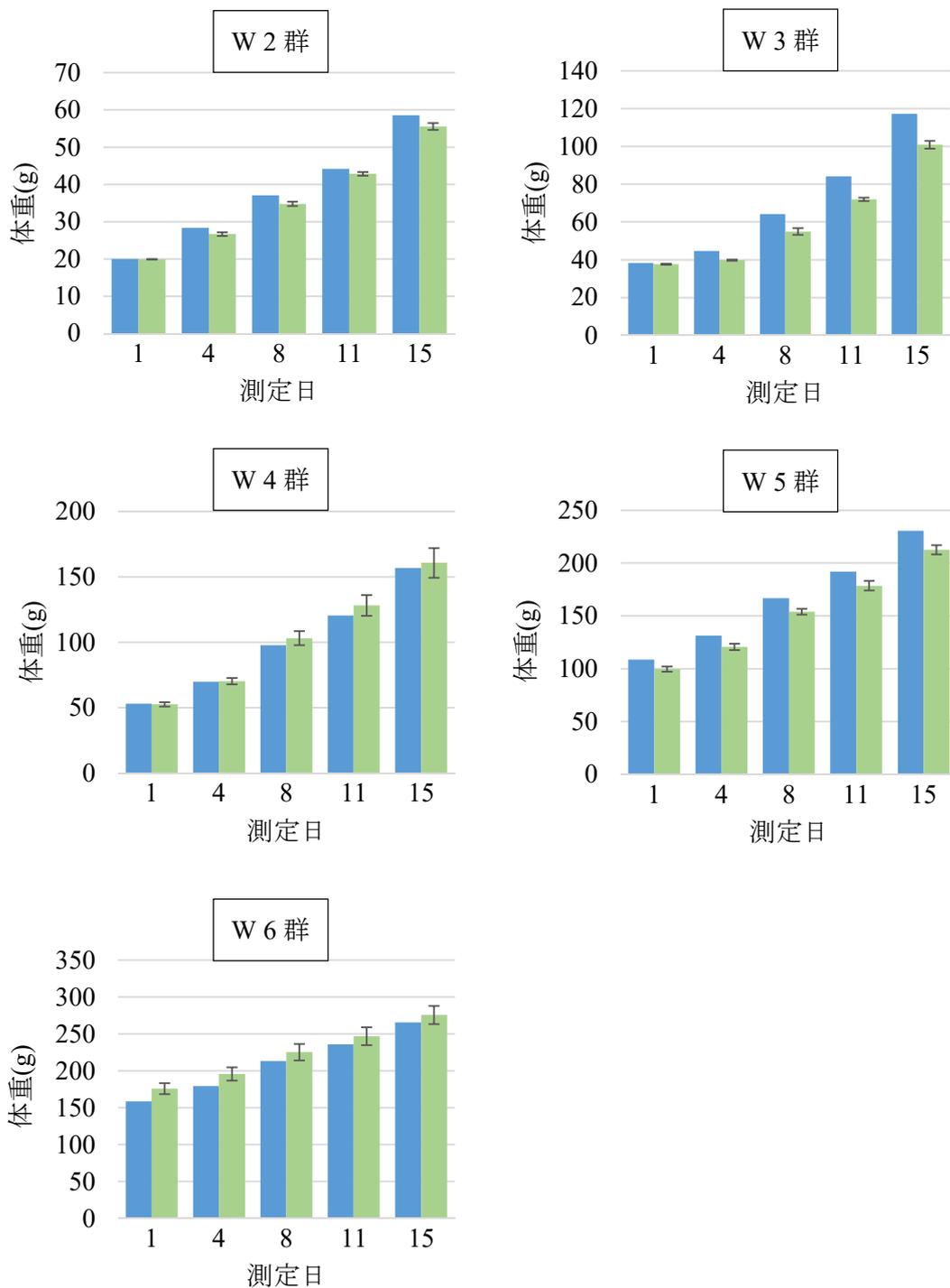


Fig. 17 投与臨界期検討試験 体重

X 軸に測定日 (投与開始日を 1 と規定) を、Y 軸に各群の体重の平均値 (g) 及び標準偏差 (エラーバー) を示す。

■ : 対照群 (n=2) 、 ■ : 300 mg/kg 投与群 (n=3)

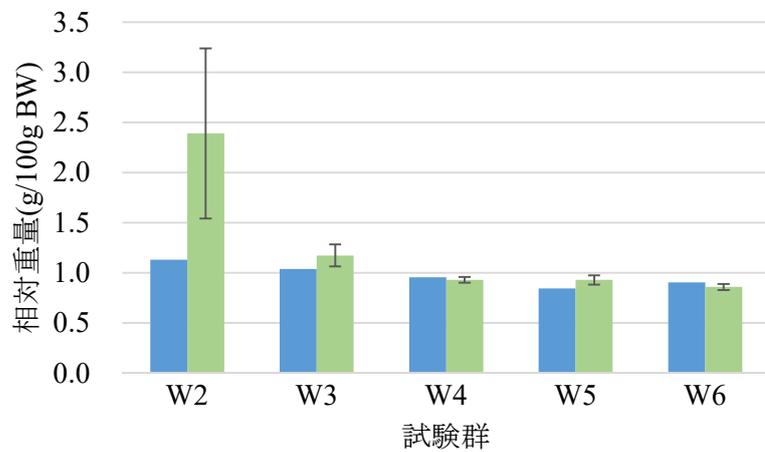
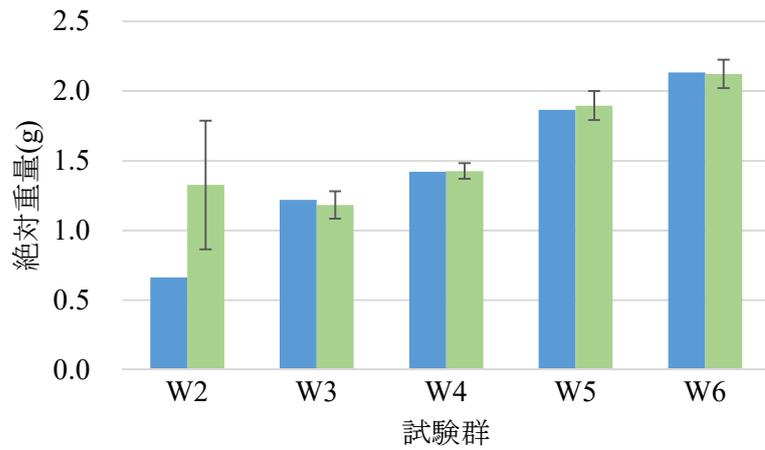


Fig. 18 投与臨界期検討試験 腎臓重量

X 軸に試験群を、Y 軸に各群の腎臓重量（絶対・相対）の平均値及び標準偏差（エラーバー）を示す。

■ : 対照群 (n=2) 、 ■ : 300 mg/kg 投与群 (n=3)



Fig. 19 投与臨界期検討試験 剖検時肉眼所見  
W2 群・PCP 投与群のホルマリン固定後腎臓の輪切り断面。 ➡：嚢胞

Table 9 投与臨界期検討試験 病理組織学検査総括

| 評価部位 | 所見                         | 試験群     |         |      |      |      |
|------|----------------------------|---------|---------|------|------|------|
|      |                            | W2 群    | W3 群    | W4 群 | W5 群 | W6 群 |
| 髄質外帯 | 集合管の嚢胞状拡張<br>(過形成上皮が内側を覆う) | 4 (3.0) | 2 (1.3) | 0    | 0    | /    |
|      | 集合管の単細胞壊死                  | 1 (1.0) | 1 (0.3) | 0    | 0    | /    |
|      | 集合管の核分裂像                   | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 0    | 0    | /    |
| 髄質内帯 | 集合管の拡張                     | 1 (1.0) | 1 (0.3) | 0    | 0    | /    |
| 腎乳頭部 | 乳頭管の拡張                     | 2 (1.7) | 1 (0.3) | 0    | 0    | /    |

0：変化なし、1：軽微、2：軽度、3：中等度、4：高度、各群の最も強いグレードを記載し、( )内は平均値を表す。

/：W6 群は組織学検査を実施せず。

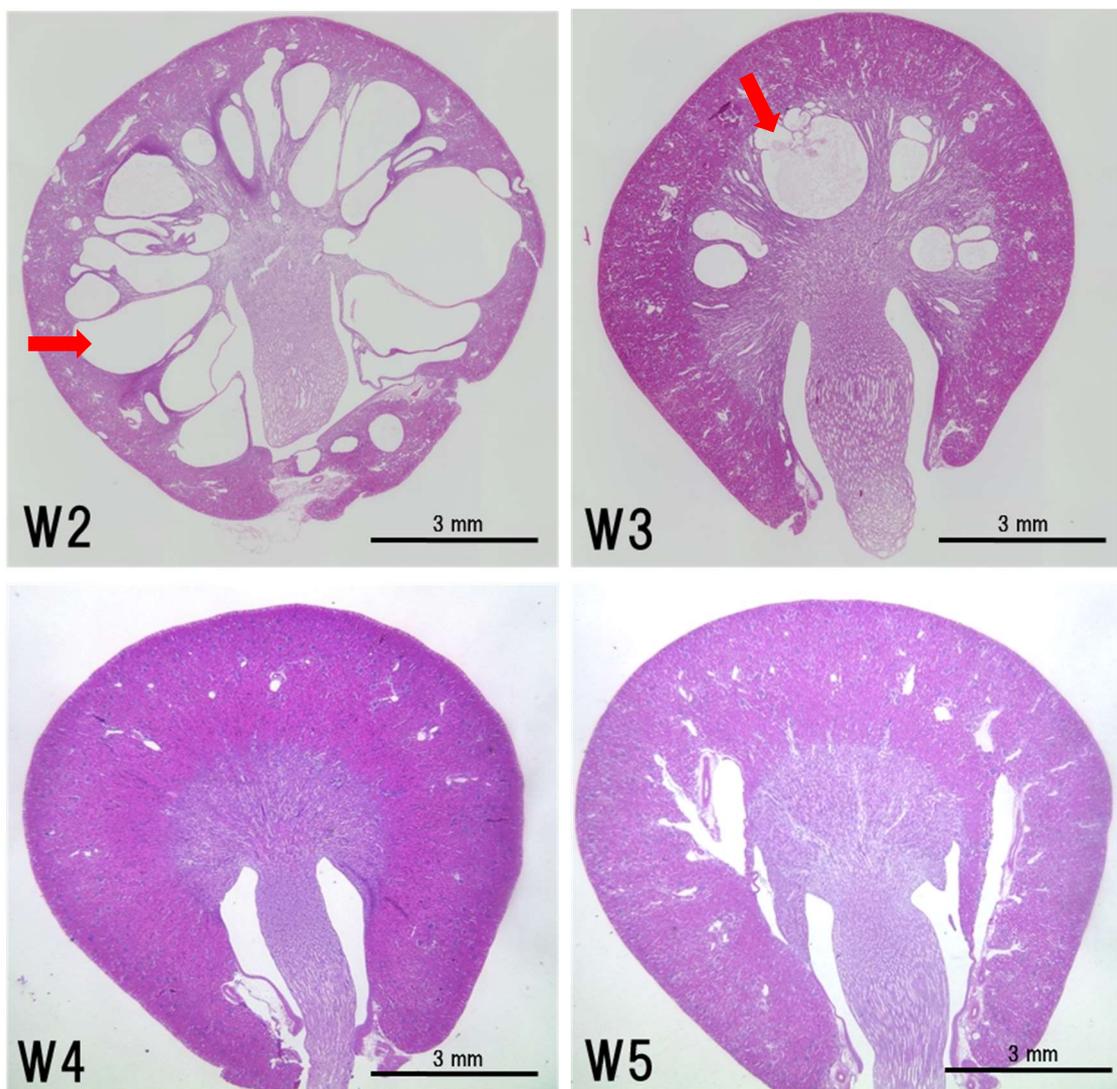


Fig. 20 投与臨界期検討試験 病理組織学検査（低倍像）

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 PCP 投与群 低倍像 W2 : W2 群、**→** : 集合管の囊胞状拡張（囊胞）、W3 : W3 群、**→** : 集合管の囊胞状拡張（囊胞）、W4 : W4 群、変化なし、W5 : W5 群、変化なし

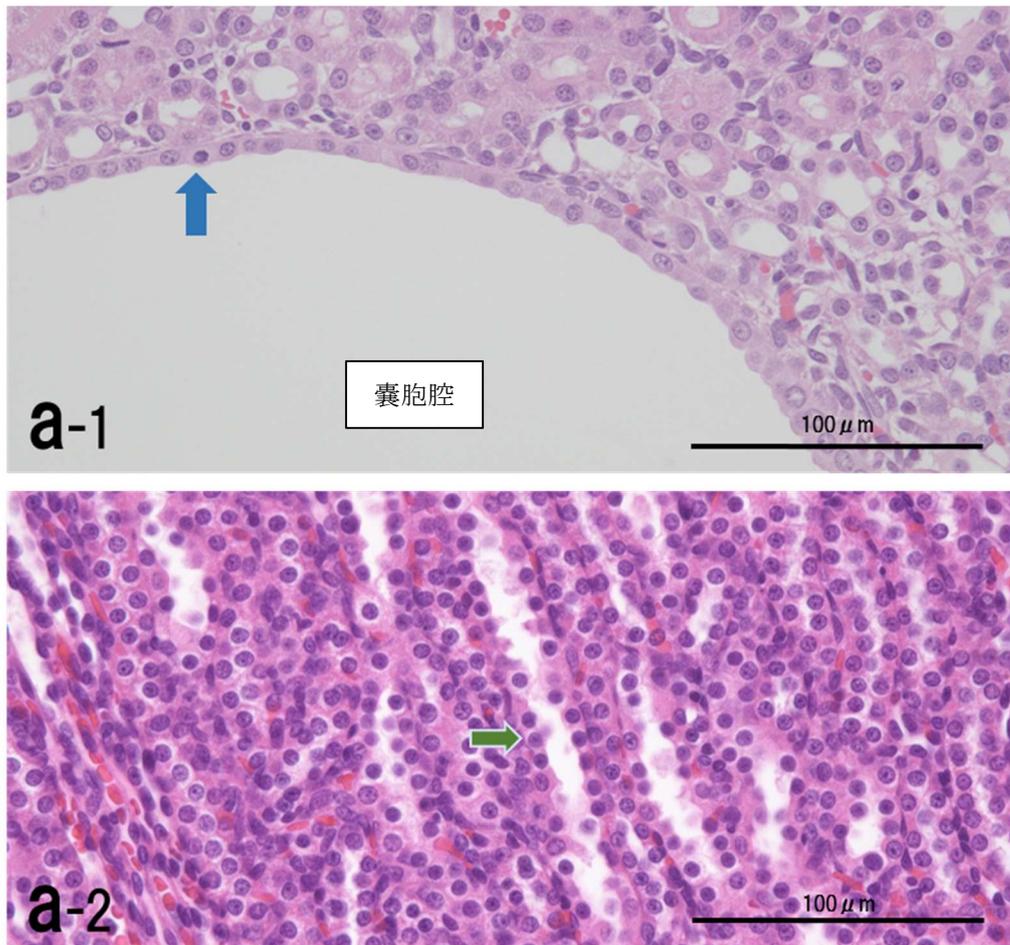


Fig. 21 投与臨界期検討試験 病理組織学検査 (W2 群)

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 (a) (a-1 : PCP 投与群、髓質外帯、集合管の囊胞状拡張 (囊胞)、 ↑ : 分裂像、a-2 : 媒体対照群、髓質外帯、 → : 集合管)

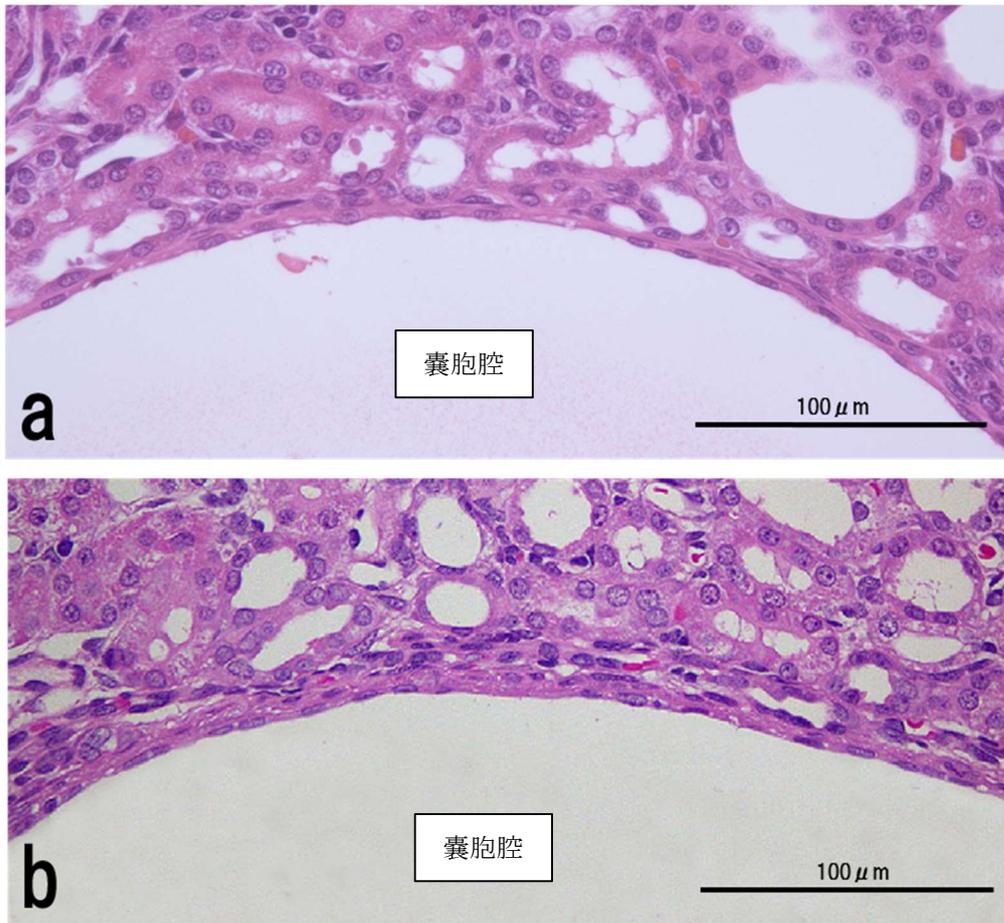


Fig. 22 投与臨界期検討試験 病理組織学検査 (W3 群)

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 (a)PCP 投与群、W3 群、髄質外帯、集合管の嚢胞状拡張 (嚢胞)、(b) 第二章・反復経口投与試験、回復群、集合管の嚢胞状拡張 (嚢胞)

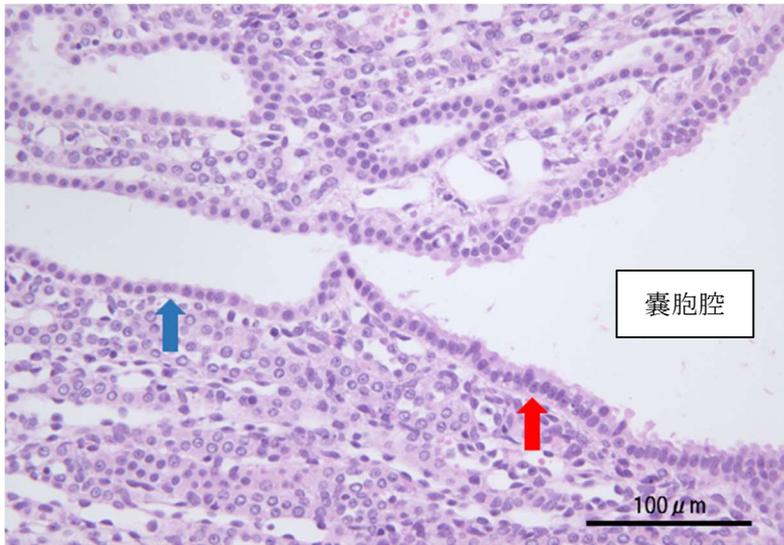


Fig. 23 投与臨界期検討試験 病理組織学検査（亜連続標本）

ヘマトキシリン・エオジン染色標本 約 10  $\mu\text{m}$  ごとの亜連続標本。W2 群・PCP 投与群の嚢胞状集合管（嚢胞）と非嚢胞状集合管の接合部を示す。

↑：非嚢胞状集合管の上皮（嚢胞に対して下流）

↑：嚢胞状集合管（嚢胞）の上皮

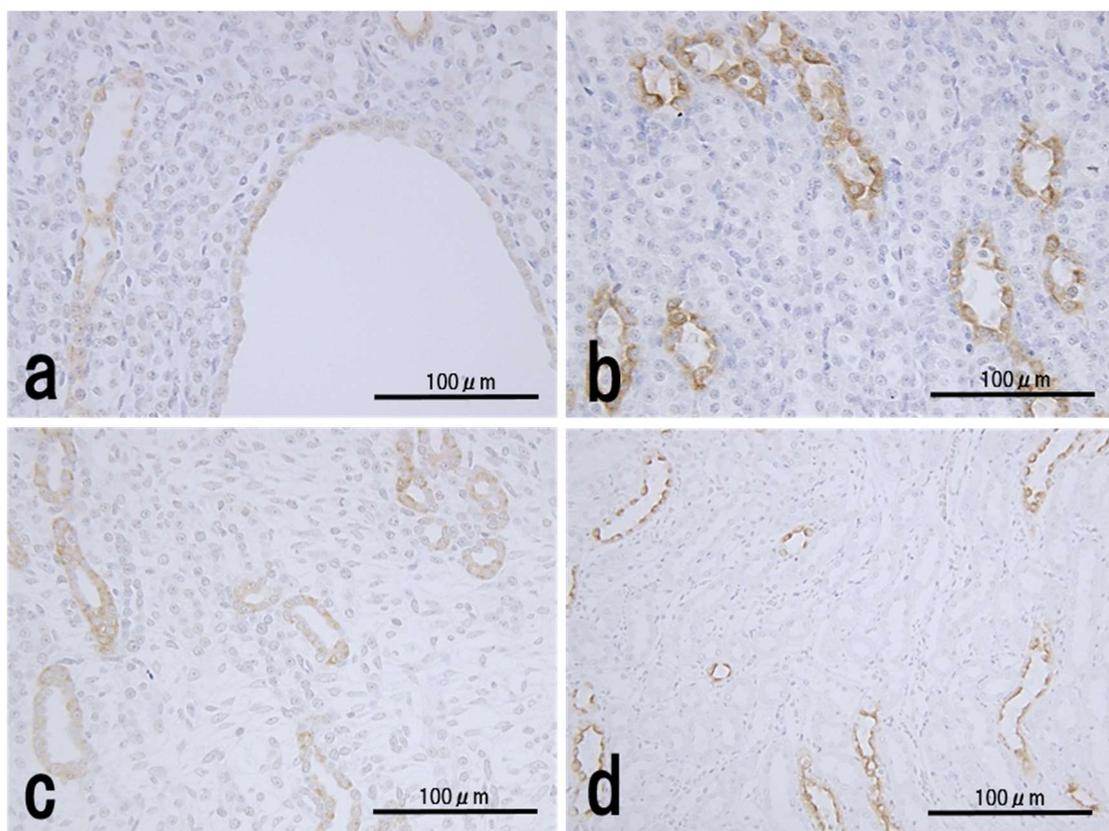


Fig. 24 抗アクアポリン2抗体による免疫組織化学染色

抗アクアポリン2 (AQP2) 抗体染色 (茶色: 陽性) (a) 投与臨界期検討試験・W2群・PCP投与群、髄質外帯、嚢胞状集合管 (嚢胞)、(b) 4週齢無処置動物 髄質外帯、(c) 4日齢無処置動物 髄質外帯、(d) 10週齢無処置動物 髄質外帯

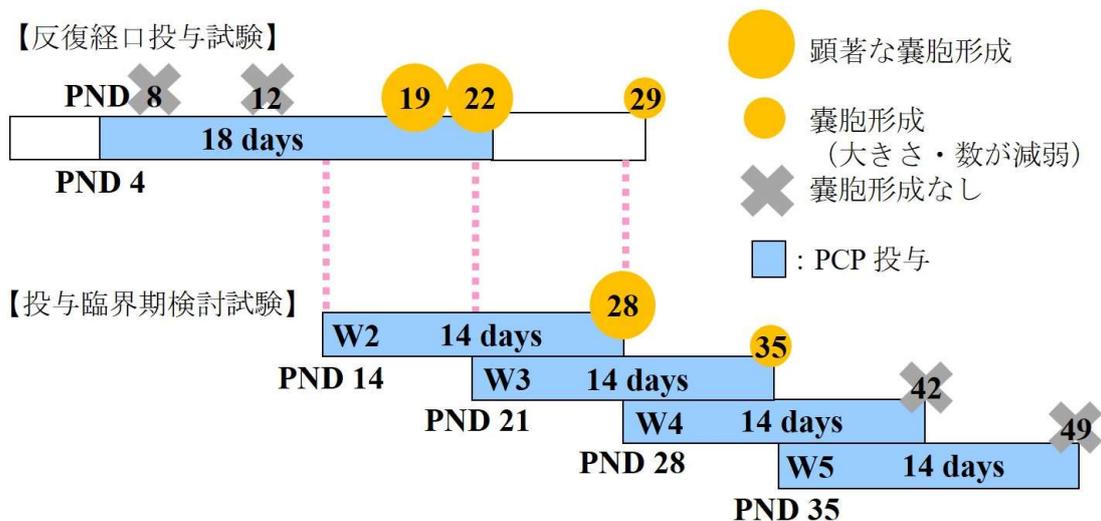


Fig. 25 投与臨界期検討 まとめ

【反復経口投与試験（第二章）】では PND4-12 に囊胞の形成はなく、PND19、22 及び 29 で囊胞の形成がみられた。PND29 は一週間の休薬期間をおいた回復群であり、囊胞は PND19 及び 22 と比較して大きさ・数が減弱していた。【投与臨界期検討試験（第三章）】では PND14-28 に顕著な囊胞形成がみられ、PND21-35 では囊胞がみられたが、PND14-28 と比較して囊胞の大きさ・数が減弱していた。PND28 以降では囊胞の形成はみられなかった。以上の結果から PCP 投与により囊胞が形成される投与臨界期は PND14-28 と考えられた。

## 総括

本研究では成獣ラットと新生児ラットにおいて腎臓に異なる病理所見を生じさせ、特に新生児ラットでは特徴的な多発性嚢胞腎を惹起し、さらに新生児ラットであってもその投与時期によって腎病変の発生状況が異なるという毒性学的プロファイルを有する化学物質である、*p*-クミルフェノール (*p*-cumylphenol: PCP) を用いて、新生児ラットに経口投与した際の腎臓を病理学的に解析した。

第一章では PCP が新生児ラットの腎臓に及ぼす毒性プロファイルを探るため、そして実験を進めるにあたり反復経口投与での投与量を検討する目的で生後 4 日齢 (postnatal day 4: PND4) の新生児ラットを用いた PCP の単回経口投与試験を実施した。その結果、600 mg/kg の用量で腎臓の尿細管に軽微な拡張病変が惹起されたが、この用量は致死量でもあった。PCP の新生児ラットにおける反復経口投与試験における用量を設定するにあたり、致死量を避け、さらに反復投与によって致死量が低くなることが想定されることから、今回の単回投与では腎臓に病変は誘発されなかったが、既報を参考に 300 mg/kg/日の用量で反復経口投与試験を実施することとした。

第二章では、PCP が新生児ラットの腎臓に嚢胞を形成する過程を検討するために反復経口投与試験を実施した。PCP を 300 mg/kg/日の用量で新生児ラットに PND4 から投与を開始し、4、8、15 及び 18 日間、1 日 1 回経口投与し、投与終了の翌日に剖検を実施した。それぞれを剖検日から PND8、12、19 及び 22 日剖検群とした。また、回復性を検討する目的で 18 日間の最終投与後に 1 週間の休薬期間を設けた回復群を設定した。剖検により得た腎臓を病理組織学的に詳細に観察するとともに、嚢胞形成に対する細胞増殖の関与について増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) 陽性率を算出することで検討した。PCP を 300 mg/kg/日で反復経口投与した結果、PND19 及び 22 剖検群には髓質外帯に局在した大型の嚢胞が多発性

に認められ、嚢胞腎の像を呈した。嚢胞化した管腔構造はその形態から髄質外帯を走行する集合管に由来するものと推測され、また、回復群の病態解析から嚢胞は可逆性であることが示された。一方、髄質内帯には PND8、12、19 及び 22 剖検群で軽微な拡張集合管が認められたが、この所見は投与期間を延長しても拡張の程度が増強されることはなく、髄質外帯に嚢胞がみられた PND19 及び 22 剖検群と同所見がみられていない PND8 及び 12 剖検群において、髄質内帯の集合管は拡張の程度に差が無かったことから、髄質内帯の拡張集合管は髄質外帯の嚢胞とは独立した病変と考えられた。また、PND19 以降に髄質外帯の多発性の嚢胞に進行すると考えられる髄質外帯における軽微な拡張や細胞分裂像の増加などの初期病変は、髄質外帯にも腎臓の他の部位にも PND12 まで何ら観察されなかった。したがって、PND19 及び 22 剖検群で観察された髄質外帯の嚢胞は PND12 と PND19 の間に形成されたと考えられた。嚢胞状集合管の上皮には細胞増殖を示す高密度の核分布や高い PCNA 陽性率がみられたこと、そして、PCP の投与を中止するとこれらの細胞増殖活性を示す像が消失することから、PCP 投与が髄質外帯に分布する集合管上皮の増殖に作用する可能性が示され、嚢胞の形成に細胞増殖が関わっているものと考えられた。さらに、細胞増殖を促す傷害性変化が先行することはなく、正常の集合管構造を逸脱している嚢胞の形態学的特徴から、PCP が局所でマイトジェンとして働き、集合管の特定の領域に複製性増殖を惹起したものと推測された。

第三章では、PCP が新生児ラットに嚢胞を惹起するにあたり、投与時期に臨界期があることを示すとともに、嚢胞の組織発生について、再度の検討を行った。

実験には新生児ラットの PND14-28、21-35、28-42、35-49 及び 42-56 に 300 mg/kg/日の用量で反復経口投与する 5 群を設けた。その結果、PND14-28 投与で髄質外帯に最も顕著な多発性の嚢胞が形成され、PND21-35 ではその程度が減弱し、PND28 以降の投与では嚢胞形成は認められなかった。PND28 以降の投与では嚢胞が発生し

ていなかったこと、及び PND21-35 群の組織像と第二章の 1 週間休薬群にみられた組織像が、各章の試験で集合管の嚢胞状拡張の程度が最も強かった群の組織像と比べて形態的に嚢胞の数が少なく、嚢胞腔が円形状を呈し、内張りする上皮が扁平であり分裂像が観察されなかったという点で類似していることから、PND21-35 群の後半の 1 週間には PCP の集合管の嚢胞形成作用は消失しているものと推察された。以上より、PCP の新生児ラットに対する嚢胞誘発には PND14-28 が投与臨界期であると判断された。この投与臨界期には、新生児ラット特有の腎臓の発生過程が深く関わっているものと考えられ、成長に伴い PND28 以降では PCP が集合管の嚢胞状拡張を引き起こす作用点が消失または変化したものと推測された。

また、第三章では髄質外帯に嚢胞が形成された腎臓に集合管のマーカーであるアクアポリン 2 (aquaporin 2: AQP2) の免疫組織化学染色を施すとともに、亜連続標本作製して、嚢胞の全貌を詳細に鏡検した。嚢胞は抗 AQP2 抗体に陽性を示し、集合管由来であることが確認された。亜連続標本の観察により嚢胞は髄質外帯に分布する正常の集合管の一部が局所的に拡張したものであり、開放的に上流及び下流の尿流路と連続しており、嚢胞発生に閉塞性病変の関与はないこと、さらに腫瘍性への形質転換はないことが示された。一方、AQP2 はヒトの多発性嚢胞腎の形成と関与が言われていることから、新生児ラットと成獣ラットの発現分布を比較したが、PCP 投与による嚢胞形成と AQP2 の関与は証明できなかった。

PND14-28 という集合管の嚢胞が発生する投与臨界期が存在することは、PCP が有する髄質外帯での集合管の嚢胞化作用を発揮するために必要不可欠な分子がこの期間に限定的に発現していることを意味するので、PCP や類似構造を持つ化学物質の腎障害についての病理発生機序を解明するには、その分子あるいは分子群を探索することが糸口になるものと考えられた。

モデル動物またはヒトの多発性嚢胞腎の報告から、PCP の作用機序を検討するに

あたり、1) 上皮細胞の増殖および分化の異常の解析として、細胞増殖因子の発現分布及び発現量の確認、2) 尿細管基底膜成分および関連する細胞外マトリックスの解析、3) 主要な受容体および酵素の局在異常を伴う上皮細胞の極性の異常の解析として、繊毛の超微細形態観察及び繊毛上分子の発現分布及び発現量の確認、4) 上皮からの液輸送の異常の解析として各種トランスポータータンパク質の発現量の確認を実施すべきと考える。

以上の結果から、PCPは新生児ラットの腎臓に多発性の嚢胞を形成すること、そして、嚢胞は髄質外帯に分布する集合管から発生する局在性の病変であることが示された。また、嚢胞の形成には当該部位の細胞増殖が関与している可能性が示唆された。さらにその作用が発揮されるPND14-28という臨界期が見出され、この投与臨界期には新生児ラット特有の腎臓の発生過程が深くかかわっているものと考えられた。よって、PCPの毒性試験では4週齢以上の動物を使用した場合、検出できない変化があることが示された。PCPのみの検証ではあるが、同様の事象が他の化学物質の幼若動物への投与でも起こる可能性があり、毒性試験では幼若動物試験の実施も含め、試験に使用する動物の主要器官の発生時期を考慮する必要があると考えられた。

本研究の一部は以下の科学論文に公表した。

- 1) Nakazawa T, Kasahara K, Ikezaki S, Yamaguchi Y, Edamoto H, Nishimura N, Yahata M, Tamura K, Kamata E, Ema M, and Hasegawa R. Renal tubular cyst formation in newborn rats treated with p-cumylphenol. *J Toxicol Pathol.* 22: 125-131. 2009. (第二章)
- 2) Nakazawa T, Yamaguchi Y, Fukunaga Y, and Tamura T. A possible critical dosing

period of p-cumylphenol for development of cystic kidneys in rat neonates. J Toxicol

Pathol. 35: 123-127. 2022. (第三章)

## 謝辞

本論文をまとめるにあたりご指導とご鞭撻を賜りました、麻布大学獣医学部動物応用科学科動物工学研究室、滝沢達也教授及び獣医学科小動物臨床研究室、斑目広郎教授並びに獣医学科病理学研究室、上家潤一教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり、ご指導とご鞭撻をいただきました株式会社ボゾリサーチセンター、田村一利常務、山口裕子病理部長、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理研究室、土井邦雄名誉教授、東京農工大学大学院農学研究院、三森国敏名誉教授に心より感謝申し上げます。

本実験を遂行するために貴重な命を捧げてくれた多くの実験動物の冥福を祈るとともに、深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、多大なるご協力を頂いた株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所研究部、病理部及びつくば研究所病理部の皆さまに厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- Barnett LMA, and Cummings BS. Nephrotoxicity and renal pathophysiology: A contemporary perspective. *Toxicol. Sci.* 164: 379-390. 2018.
- Bartoli E. Adverse effects of drugs on the kidney. *Eur. J. Intern. Med.* 28: 1–8. 2016.
- Bisht S, Khan MA, Bekhit M, Bai H, Cornish T, Mizuma M, Rudek MA, Zhao M, Maitra A, Ray B, Lahiri D, Maitra A, and Anders RA. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc™) ameliorates CCl4-induced hepatic injury and fibrosis through reduction of pro-inflammatory cytokines and stellate cell activation. *Lab Invest.* 91: 1383–1395. 2011.
- Bueters R, Bael A, Gasthuys E, Chen C, Schreuder MF, and Frazier KS. Ontogeny and cross-species comparison of pathways involved in drug absorption, distribution, metabolism, and excretion in neonates (Review): Kidney. *Drug Metab Dispos.* 48: 353-367. 2020.
- Butterworth BE, Lounsbury DJ, Smith-Oliver T, and Cattley RC. The potential role of chemically induced hyperplasia in the carcinogenic activity of the hypolipidemic carcinogens. *Toxicol Ind Health.* 3: 129-49. 1987.
- Butterworth BE, Popp JA, Conolly RB, and Goldsworthy TL. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *IARC Sci Publ.* 116: 279-305. 1992.

Carthew P, Edwards RE, and Nolan BM. The quantitative distinction of hyperplasia from hypertrophy in hepatomegaly induced in the rat liver by phenobarbital. *Tox Sci.* 44: 46-51. 1998.

Frazier KS. Review article: Species differences in renal development and associated developmental nephrotoxicity. *Birth Def Res.* 109: 1243–1256. 2017.

Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Koizumi M, Hasegawa R, Kamata E, and Ema M. Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. *Toxicol Lett.* 21: 145–155. 2004.

Guay-Woodford LM. Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285: 1034-1049. 2003.

Gu X, and Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev Mol Med.* 14: e4. 2012.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, and Ema M. Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. *Congenit Anom.* 45: 137–145. 2005.

Higgins GM, and Anderson RM. Experimental pathology of the liver. In : *Archives of Pathology* . Hektoen L, Ewing J, Ophuls W, Wolbach SB, MacCallum WG, Stengel A, and Schultz OT. (eds), American Medical Association, Chicago, IL. 186-202. 1931.

Iatropoulos MJ, Newman AJ, Dayan AD, Brughera M, Scampini G, and Mazue G. Urinary bladder hyperplasia in the rat: non-specific pathogenetic considerations using a beta-lactam antibiotic. *Exp Toxicol Pathol.* 46: 265-274. 1994.

Igarashi P, and Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 13: 2384-2398. 2002.

Iino N, Gegyo F, Arakawa M, and Ushiki T. Three-dimensional analysis of nephrogenesis in the neonatal rat kidney: light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol.* 64: 179-190. 2001.

Iqubala A, Iqubalb MK, and Haquea SE. Experimental hepatotoxicity Inducing agents: A Review. *Int J Clin Pharmacol Res.* 6: 325-335. 2016.

Kaimori JY, Lin CC, Outeda P, Garcia-Gonzalez MA, Menezes LF, Hartung EA, Li A, Wu G, Fujita H, Sato Y, Nakanuma Y, Yamamoto S, Ichimaru N, Takahara S, Isaka Y, Watnick T, Onuchic LF, Guay-Woodford LM, and Germino GG. NEDD4-family E3 ligase dysfunction due to PKHD1/Pkhd1 defects suggests a mechanistic model for ARPKD pathobiology. *Sci Rep.* 10: 7733. 2017.

Khan KNM, and Alden CL. 33 Kidney. In: Handbook of Toxicologic Pathology. Haschek WM, Roussesaux CG, and Wallig MA. (eds), Academic Press, London. 255-336. 2002.

Lake BG, Evans JG, Cunninghame ME, and Price RJ. Comparison of the hepatic effects of nafenopin and WY-14,643 on peroxisome proliferation and cell replication in the rat and Syrian hamster. *Environ. Health Perspect.* 101: 241-248. 1993.

Latendresse JR, Newbold RR, Weis CC, and Delclos KB. Polycystic kidney disease induced in F (1) Sprague-Dawley rats fed para-nonylphenol in a soy-free casein-containing diet. *Toxicol Sci.* 62: 140–147. 2001.

Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Molecular Endocrinology.* 17:309-317. 2003.

Lindström NO, McMahon JA, Guo J, Tran T, Guo Q, Rutledge E, Parvez RK, Saribekyan G, Schuler RE, Liao C, Kim AD, Abdelhalim A, Ruffins SW, Thornton ME, Baskin L, Grubbs B, Kesselman C, and McMahon AP. Conserved and Divergent Features of Human and Mouse Kidney Organogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 29: 783-805. 2018.

Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy critical analysis of mechanistic dilemma. *The American Journal of Pathology.* 176: 2-13. 2010.

Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao N, Nakamura K, Tomita K, Kitamura T, Kurabayashi M, Nagai R, Higashihara E, Harris PC, Katsuki M, and Horie S. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet.* 11: 1731–1742. 2002.

Orellana SA, Sweeney WE, Neff CD, and Avner ED. Epidermal growth factor receptor expression is abnormal in murine polycystic kidney. *Kidney International*. 47: 490-499. 1995.

Rojek A, Füchtbauer E-M, Kwon T-H, Frokiær J, and Nielsen S. Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 6037-6042. 2006.

Sanchez IM, and Bull RJ. Early induction of reparative hyperplasia in the liver of B6C3F1 mice treated with dichloroacetate and trichloroacetate. *Toxicology*. 64: 33-46. 1990.

Schwartz GJ, Olson J, Kittelberger AM, Matsumoto T, Waheed A, and Sly WS. Postnatal development of carbonic anhydrase IV expression in rabbit kidney. *Am J Physiol*. 276: 510-520. 1999.

Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: Juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol*. 30: 125-133. 2017.

Snodgrass WR. Physiological and Biochemical Differences between Children and Adults as Determinants of Toxic Response to Environmental Pollutants. In: Similarities and Differences between Children and Adults, Implications for Risk Assessment. Guzelian PS, Henry CJ, and Olin SS. (eds), ILSI press, Washington DC. 35-42. 1992.

Solhaug MJ, Bolger PM, and Jose PA. The developing kidney and environmental toxins.

*Pediatrics*. 113: 1084-1091. 2004.

Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, and Hasegawa T. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem. Cell Biol.* 130: 197-209. 2008.

Torres VE, Harris PC, and Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*. 14: 1287–1301. 2007.

Wang Y, Shen L, Zhao G, Li B, Bu J, Zhu C, Jiang B, and Wang S. Histomorphological characteristics and pathological types of hyperproliferation of gastric surface epithelial cells. *Gastroenterol Res Pract*. Volume 2021 Article ID 8828326  
<https://doi.org/10.1155/2021/8828326>

Zoetis T, and Hurtt ME. Species comparison of anatomical and functional renal development. *Birth Def Res.* 68:111-120. 2003.

医薬品非臨床試験ガイドライン研究会. 医薬品 非臨床試験ガイドライン 解説  
2020. 薬事日報社. 東京. 2020.

化合物安全性研究所. p- ( $\alpha, \alpha$ -ジメチルベンジル) フェノールのラットにおける急性経口投与毒性試験最終報告書. 化合物安全性研究所. 北海道. 1999 a.

化合物安全性研究所. 分析証明書 p- ( $\alpha, \alpha$ -ジメチルベンジル) フェノールの急性経口投与及び 28 日間反復経口投与毒性試験における被験物質調整液の安定性及び

濃度確認試験. 化合物安全性研究所. 北海道. 1999 b.

香村衡一. 多発性嚢胞腎—ここ 10 年の進展と 2002 年の話題—. *IRYO*. 57: 551-557. 2003.

土谷健, 眞壁志帆, 片岡浩史, 望月俊雄, 新田孝作. 総説: 多発性嚢胞腎の診断・治療の進歩. *人間ドック*. 32: 444-455. 2017.

中西浩一, 吉川徳茂. 特集: 多発性嚢胞腎—最新の知見と今後の課題 ARPKD の基礎と臨床—最新の知見. *日腎会誌*. 54: 534-537. 2012.

増田康輔. 四塩化炭素からトキシコロジーを学ぶ. *YAKUGAKU ZASSHI*. 126: 885-899. 2006.

松崎利行. 細胞膜水チャネル アクアポリン 腎臓を中心にして. *日医大医会誌*. 5: 118-124. 2009.

村井隆, 副島昭治. 6.14 腎臓, *伊東毒性病理学*, 高橋道人, 福島昭治 (編), 丸善出版, 東京都, 273-302, 2013.

European chemical agency: ECHA 「Registration dossier 4-( $\alpha,\alpha$ -dimethylbenzyl)phenol」 2005.

<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/2159/7/6/2> (参照 2021 年 10 月 11 日)

European Medicines Agency 「ICH guideline S11 on nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals - Step 5」 2018.

<https://www.ema.europa.eu/en/ich-guideline-s11-nonclinical-safety-testing-support-development-paediatric-pharmaceuticals-step-5> (参照 2022 年 1 月 27 日)

Food and Drug Administration: FDA 「Guidance for Industry Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products」 2006.

<https://www.fda.gov/media/119658/download> (参照 2022 年 1 月 27 日)

Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD 「OECD Test Guidelines for Chemicals」 1987.

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>  
(参照 2022 年 1 月 27 日)

Seely JC, and Brix A. 「NTP Nonneoplastic Lesion Atlas: Kidney, Renal tubule-Regeneration」 2014.

[https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/urinary/kidney/rtregen/kidney-tubule-regeneration-pdf\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/urinary/kidney/rtregen/kidney-tubule-regeneration-pdf_508.pdf)  
(参照 2022 年 1 月 27 日)

環境省 「信頼性評価及び試験の実施状況 テトラブロモビスフェノール A (CAS no. 79-94-7) 」 2010.

[https://www.env.go.jp/chemi/end/substances/067\\_RE\\_JP\\_TetrabromobisphenolA.pdf](https://www.env.go.jp/chemi/end/substances/067_RE_JP_TetrabromobisphenolA.pdf)  
(参照 2022 年 1 月 27 日)

環境省「信頼性評価及び試験の実施状況 4-ノニルフェノール（分岐型）（CAS no. 84852-15-3）」 2014.

[https://www.env.go.jp/chemi/end/substances/085\\_RE\\_JP\\_4-Nonylphenol\\_branched.pdf](https://www.env.go.jp/chemi/end/substances/085_RE_JP_4-Nonylphenol_branched.pdf)

（参照 2022 年 1 月 27 日）

## Abstract

Neonates are anatomically and functionally still under development in all the organs, and thus, they may react to xenobiotics in a manner distinctive from adults. Nevertheless, little is known about comparative pathology induced by xenobiotics in neonates or neonatal animals. Then, as part of non-clinical safety evaluation against xenobiotics in neonatal animals, an attempt was made to investigate pathological lesions found in the kidney when *p*-cumylphenol (PCP), a chemical known to induce dissimilar toxicity between adult animals and neonatal animals, was dosed to neonatal rats.

PCP is a phenol derivative and an industrial chemical widely used as a surfactant, a plasticizer of polycarbonates, an insecticide, a preservative etc. Scientific reports available thus far indicate that administration of PCP results in dilatation of the tubules, hyaline casts and regenerative tubules in the kidneys of adult rats, whereas multiple renal cysts are formed in neonatal rats. These findings indicate that PCP toxicity differs in adult rats from neonatal rats, detailed researches, however, are not reported.

A single oral dose of PCP to neonatal rats on postnatal day (PND) 4 at dose levels of 300 or 600 mg/kg revealed that the 600 mg/kg dosing was lethal though tubular dilatation was found in the kidney, and that the 300 mg/kg dosing resulted in no renal pathology. From these results, the dose of 300 mg/kg/day was selected avoiding the lethal dose and in reference to the literature for a following repeated oral dose study in neonatal rats.

In a repeated oral dose study, PCP was administered once a day to neonatal rats at a dose level of 300 mg/kg/day. The dosing was initiated on PND 4 and continued for 4, 8, 15 and 18 days. These 4 test groups were designated as the PND 8, PND 12, PND 19, and PND 22 groups, respectively. Reversibility of lesions was evaluated in a recovery group where dosing was discontinued for 1 week after the last dose on PND 22, and necropsied on PND 29.

Detailed morphological examination was performed on the kidneys, and a positive ratio to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was determined to explore any involvement of cell proliferation, a known element to contribute to renal cyst development. The repeated oral dosing of PCP at a dose level of 300 mg/kg/day to neonatal rats led to formation of large multiple cysts localized in the outer medulla of the kidneys, the morphology being consistent with cystic kidneys, in the PND 19 and 22 groups. These multiple cysts were morphologically considered to be derived from collecting ducts, and to be reversible after the cessation of dosing from the results of the recovery group. Any preceding lesions that could progress to multiple cysts observed in the renal outer medulla in the PND 19 and 22 groups were found neither within the outer medulla nor in any other regions of the kidneys in the PND 8 or 12 group, suggesting that the cystic collecting ducts were emerged in the renal outer medulla during the period from PND 12 to 19. Findings that a nuclear density and a PCNA positive ratio were high in the cystic collecting ducts, and that the cell proliferation activity disappeared upon discontinuation of dosing indicated that PCP most likely influenced the cell proliferation activity of the regional collecting duct in the renal outer medulla during the limited period of time in renal development.

As the dosing period of PCP clearly varied the manner of development of the cystic kidney in neonatal rats, the critical dosing period was suspected for PCP to exert this potential. Then, to investigate how PCP dosing in various PNDs modified the manner of development of cystic kidney, a repeated oral dose study was designed where PCP was administered for 14 days at a dose level of 300 mg/kg/day to neonatal rats in the delimited period of time during PND 14-28, 21-35, 28-42, 35-49, and 42-56. Multiple cysts observed in the renal outer medulla were most striking in the PND 14-28 group, and at a lesser magnitude in the PND 21-35 group, whereas either kidney was unaffected when dosing was initiated beyond PND

28. Comparable morphology obtained from the PND 21-35 group in the 14-day repeated dose study and from the 1-week recovery group in the previous repeated dose study, together with the fact that none of renal tubules turned to be cystic by PCP dosing beyond PND 28 suggested that PCP became ineffective for renal cyst formation during the last 1 week of the PND 21-35 group. These findings and a lack of cystic tubules noted during PND 4-12 in the previous study led to the conclusion that the critical dosing period was PND 14-28 for PCP to develop polycystic kidney in neonatal rats. Taken together, the critical dosing period for PCP to develop cystic kidney in neonatal rats was determined to be PND 14-28.

The PCP-induced renal cysts were further characterized in semi-serial sections and by immunohistochemistry using an antibody against aquaporin 2 (AQP2). Examinations of the complete picture of the renal cyst revealed in semi-serial sections that the cysts were formed by focal dilation of a part of the normal collecting ducts localized in the renal outer medulla, that the cystic collecting ducts were patent, connecting to the upper and lower urinary tracts, that there was no evidence of neoplastic transformation, and that obstructive lesions were not involved in the development of cystic collecting ducts. AQP2 was expressed both in the adult kidney and neonatal kidney at a comparable magnitude. AQP2 expression was also found to be comparable among the cystic collecting ducts developed in the outer medulla and the adjacent normal collecting ducts. Thus, any conclusive relationship of AQP2 was found to the cystic kidney induced by PCP in neonatal rats.

The critical dosing period of PND 14-28 for the development of the cystic kidney may suggest that distinctive molecule(s) is specifically expressed during this limited period of time for PCP to exert the potential of formation of the multiple cysts from the collecting ducts in the renal outer medulla. Investigation on such molecule(s) that appear and disappear associated with renal development during this confined period of time on the regional

collecting ducts may elucidate a pathological mode of action of nephrotoxicity evoked by PCP and its analogues.

In summary, PCP was found to be a chemical that develops multiple cysts in the kidney of neonatal rats. A series of experiments with PCP in neonatal rats demonstrated that the renal cysts were regional lesions arising from the collecting ducts localized in the outer medulla, that local cell proliferation in the cystic portion was most likely involved in the cyst formation, and that PCP was effective for this unique phenomenon during the critical period of PND 14-28, most likely in close association with unique organogenesis of the kidney in neonatal rats. Thus, essential findings are unlikely disclosed when PCP is tested in toxicity studies using rats beyond 4 weeks old. This concept can be applied to any other chemicals, leading to the notion that studies in neonatal animals should be considered in a toxicology program with a particular attention to the critical development period of each organ.