

氏名(本籍)	中澤朋美(群馬県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第7号
学位授与年月日	令和4年2月28日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	新生児ラットに <i>p</i> -cumylphenol を投与した時に生じる嚢胞腎の研究
論文審査委員	(主査) 滝沢達也 (副査) 斑目広郎 上家潤一

## 論文内容の要旨

新生児では全身の諸臓器が形態的・機能的に発生段階にあるため、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懸念される。また、医薬品や化学物質などの安全性を評価する非臨床試験において汎用されているラットでは、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、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。しかし、幼若ラットに対する外来化学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、新生児ラットと成獣ラットの毒性が異なることが報告されている *p*-cumylphenol (PCP) を被験物質として用いて、新生児ラットに投与した際の腎臓の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、殺虫剤及び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る一方で、新生児ラットでは腎臓に多発性の嚢胞が惹起されることが知られている。本研究では PCP を新生児ラットに経口投与したときに腎臓がどのような形態学的変化を示すか、また、その投与時期を変えた場合に病態がどのように修飾されるかについて検討するために一連の実験を実施した。

最初に PCP の単回経口投与試験を実施した。雌雄各 25 匹の Sprague-Dawley 系 [CrI:CD(SD)] 新生児ラットに既報を参考にして PCP を 300 mg/kg、またはより強い変化が誘発されることを期待して 600 mg/kg の投与量で出生後 4 日 (postnatal day 4: PND4) に単回経口投与した。投与後 24 時間、72 時間及び 7 日後に剖検した。600 mg/kg 投与群では観察期間中に半数近くが死亡ないしは瀕死に陥った。剖検時に腎臓を採取し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製して病理組織学検査を実施した。600 mg/kg の投与量では尿細管に拡張性の病変がみられたが、300 mg/kg

では腎臓の病理組織学的所見は観察されなかった。この結果から、次に予定している反復経口投与試験では、致死量を避け、また、反復投与により致死量が低くなる可能性を考慮して 300 mg/kg/日の投与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/日の用量で雌雄各 25 匹の CrI:CD(SD) 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、18 日間投与の最終投与後に 1 週間の休薬期間をおいた回復群を設けた。各剖検群から前述と同様に腎臓の HE 染色標本を作製して病理組織学検査を実施するとともに、腎臓の嚢胞形成の要因の一つと考えられる細胞増殖の関与について細胞増殖マーカーとして抗増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) 抗体による免疫組織染色により PCNA 陽性率を算出した。その結果、PCP の 300 mg/kg/日の反復経口投与によって、PND19 及び 22 剖検群に髄質外帯に局在して大型の嚢胞が多発性に認められ、嚢胞腎の像を呈した。この嚢胞は、その組織学的特徴から集合管由来であると考えられた。また、回復群の解析からこの嚢胞は可逆性であることが示された。PCNA 陽性率は全ての投与終了時剖検群において高い傾向を示した。PND19 及び 22 剖検群において認められた髄質外帯の嚢胞に進行すると考えられる初期病変は、PND8 あるいは 12 剖検群の髄質外帯でも他の部位でも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作用することが示された。

PCP が新生児ラットに嚢胞腎を惹起するにあたり、投与時期によってその発生様式に明瞭な違いがみられたことから、PCP がこの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、次に PCP を 300 mg/kg/日の用量で PND14-28、21-35、28-42、35-49 及び 42-56 に雄の CrI:CD(SD) 新生児ラットに反復経口投与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た。PND21-35 投与でも髄質外帯に嚢胞が多発したが、その数は PND14-28 投与に比較して減じた。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 投与の嚢胞の病理組織像と反復経口投与試験の PND22 から 1 週間休薬した回復群にみられた嚢胞の病理組織像が類似していること、および PND28 以降の投与では嚢胞が観察されないことから、PND21-35 投与の後半の 1 週間には PCP の嚢胞形成効果は消失しているものと推察された。さらに PND4-12 の反復経口投与では嚢胞が形成されなかったことも合わせ、PCP の新生児ラットの腎臓に対する嚢胞誘発効果の投与臨界期は PND14-28 であると判断された。

さらに、PCP により誘発された腎臓嚢胞を約 10 µm 毎の亜連続標本による病理組織学的観察と集合管のマーカーである抗アクアポリン 2 (AQP2) 抗体による免疫組織染色により評価した。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拡張したものであり、上流及び下流の尿流路へと開放的に連続していること、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。また、嚢胞を内張りする上皮は免疫組織染色により抗 AQP2 抗体に陽性を示したことから、嚢胞は集合管由来であることが確認された。しかし、様々な日齢の正常ラット腎臓を抗 AQP2 抗体により免疫組織染色した結果、AQP2 の腎臓における発現分布に新生児ラット特有の分布様式は認められず、髄質外帯における嚢胞形成と AQP2 との関連性は見出せなかった。

モデル動物またはヒトの多発性嚢胞腎の報告から、PCP の嚢胞形成機序を検討するにあたり、細胞増殖因子の発現分布及び発現量の確認、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、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及び各種トランスポータータンパク質の発現量の確認などが今後の検討課題であると考えられた。

以上の結果から、PCP を新生児ラットに投与すると腎臓の髄質外帯に局在した集合管由来の多発性嚢胞が誘発され、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学術論文に公表済みである。

- 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.
- 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.

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 論文の内容

新生児では、全身の諸器官が形態的・機能的に発生段階であり、同一の外来化学物質に暴露された後に起こ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-cumylphenol* (PCP) を新生児ラットに投与後の腎臓の病理学的解析を実施している。

本論文は3章から構成されている。第1章では、PCPの単回経口投与試験を実施した。出生後4日(PND4)の新生児ラットに300 mg/kg、600 mg/kgの用量でPCPを単回経口投与し、投与1日、3日及び7日後に剖検し、腎臓のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本による病理組織学的検査を実施した。600 mg/kgでは尿細管に拡張性の病変がみられ、この用量は致死量であった。300 mg/kgでは腎臓に病理組織学的所見はみられなかったが、致死量を避け、第2章の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。

第2章では、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、1日1回、4、8、15及び18日間反復経口投与した。最終投与日の翌日に剖検し、それぞれPND8、12、19及び22剖検群とした。また、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た。第1章と同様に病理学的検査を実施した。

PCPの300 mg/kg/日の反復経口投与によって、PND19及び22剖検群では髄質外帯に局在して大型の嚢胞が多発性に認められた。この嚢胞は集合管由来と考えられ、回復群では消失したことから嚢胞形成は可逆性であった。PND19及び22剖検群で認められた髄質外帯の嚢胞に進行する初期病変は、PND8あるいは12剖検群の腎臓では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嚢胞はPND12とPND19の間に形成されたものと考えられた。

第3章では、PCPの投与時期により嚢胞腎の発生様式に明瞭な違いがみられたことから、嚢胞腎誘発の投与臨界期を検討した。雄の新生児ラットを用いて、PCPを300 mg/kg/日の用量でPND14-28、21-35、28-42、35-49及び42-56の14日間反復経口投与し、検討した。その結果、PND14-28群で髄質外帯に顕著な多発性の嚢胞が形成された。PND21-35群でも嚢胞がみられたが、PND14-28群に比較して少数であり、PND28以降では嚢胞形成はみられなかったことから、PCPの新生児ラットの嚢胞腎誘発の投与臨界期はPND14-28であると判断された。

PCPにより誘発された嚢胞腎全体を亜連続標本で観察した結果、嚢胞は髄質外帯の正常な集合管の一部が局所的に拡張したものであり、上流及び下流の尿流路へと開放的に連続し、腫瘍性の形質転換はなく、嚢胞形成に閉塞性病変は関与しないことが示された。さらに、嚢胞を内張りする上皮は集合管マーカーであるAQP2陽性であることから、嚢胞は集合管由来であることが確認された。

本研究はPCPを新生児ラットに投与すると、集合管由来の嚢胞が髄質外帯に局在した嚢胞腎を誘発し、この嚢胞腎を誘発するPND14-28の投与臨界期が存在することを明らかにした。この成果は、幼若動物では外来化学物質に対する反応が器官の発生時期に伴って変化することがあり、この現象は成獣を用いた非臨床試験からは予測できない毒性が起こる可能性を示しており、試験動物の日齢や週齢を検討した上で対象となる被験物質のリスク評価を実施することの重要性を示したものであり、毒性病理学分野に貢献する有用な知見である。

## 2. 論文審査

### 1) テーマの立て方

新生児では、全身の諸器官が形態的・機能的に発生段階であるため、同一の外来化学物質に暴露された後に起こ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。このことに申請者は注目し、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 PCP を用いて、新生児ラットに投与した際の腎臓の病理学的解析を実施している。病理組織学的手法により、新生児ラットの腎臓における影響を精査しようとしており、明確なテーマが設定され、検討項目が整理されて示されている

### 2) 研究の背景

PCP はフェノール誘導体であり、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、殺虫剤及び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ている。一方、新生児ラットでは腎臓に多発性の嚢胞が形成されることが知られている。このような背景から、申請者は本論文のテーマ設定に至り、先行研究の知見を整理し、目的と関連づけて活用している。

### 3) 研究の方法

PCP を新生児ラットに投与した際の腎臓の病理学的解析を実施するために、申請者は、まず、第 1 章、第 2 章において、PCP の単回投与試験と反復投与試験により、PCP 投与により誘発される腎臓の主要病変を把握し、次いで第 3 章において、PCP により誘発される腎臓髄質外帯の嚢胞形成の投与臨界期を明らかにする試験を行うなど、段階的に研究を進めている。また、嚢胞形成の発現機序を検討するために細胞増殖マーカーを用いて検討するとともに、亜連続標本を用いて誘発された嚢胞全体を観察し、嚢胞が上下の尿流路へと開放しているのかどうか等を検索している。さらに、通常の HE 染色標本に加えて免疫組織染色標本を用いて、細胞増殖マーカーや集合管マーカーの発現を観察するなど、様々な手法を用いて検討し、目的とテーマにふさわしい研究手法を用いて明確な解析の視点を示している。

### 4) 研究の結果

第 1 章では、PCP の単回経口投与により、600 mg/kg では尿細管に拡張性の病変がみられ、この用量は致死量であった。300 mg/kg では腎臓に病理組織学的所見はみられなかった。

第 2 章では、PND19 及び 22 剖検群において、300 mg/kg/日の PCP 反復経口投与により、腎髄質外帯に局在して大型の嚢胞が多発性に認められる嚢胞腎が誘発された。この嚢胞は集合管由来と考え

られ、回復群では消失したことから嚢胞形成は可逆性であった。PND19 及び 22 剖検群で認められた髄質外帯の嚢胞に進行する初期病変は、PND8 あるいは 12 剖検群の腎臓では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嚢胞は PND12 と PND19 の間に形成されたものと考えられた。

第 3 章では、PCP の新生児ラットの嚢胞腎を誘発する投与臨界期は PND14-28 であると判断された。さらに PCP により誘発された嚢胞は髄質外帯の正常な集合管の一部が局所的に拡張したものであり、上流及び下流の尿流路へと開放的に連続し、腫瘍性の形質転換はなく、嚢胞形成に閉塞性病変は関与しないことが示された。さらに、嚢胞を内張りする上皮は集合管マーカーである AQP2 陽性であり、嚢胞は集合管由来であることが確認された。

いずれも十分な病理組織標本を元に精緻に観察し、データをまとめて解析している。

#### 5) 考察と結論

本研究により、PCP を新生児ラットに投与すると腎臓の髄質外帯に局在した集合管由来の多発性の嚢胞からなる嚢胞腎が誘発され、この嚢胞腎を誘発する PND 14-28 の投与臨界期が存在することが示された。幼若動物では外来化学物質に対する反応が器官の発生時期に伴って変化することがあり、本研究成果は成獣を用いた非臨床試験の結果からは予測できない毒性が起こる可能性を示しており、試験動物の日齢や週齢を検討した上で対象となる被験物質のリスク評価を実施することの重要性を示し、毒性病理学分野に貢献する有用な知見である。

#### 6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

### 3. 審査結果

本論文の内容と論文発表会での質疑に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、また、本研究は毒性病理学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（学術）の学位を授与するに相応しいと判定した。