

博 士 論 文

シスプラチン誘発ラット腎障害マーカーとしての尿中
kidney injury molecule-1 (Kim-1) の有用性

Usefulness of urinary kidney injury molecule-1 (Kim-1)
as a biomarker for cisplatin-induced kidney injury
in rats

静岡県立大学大学院 薬学研究科
衛生分子毒性学講座

南谷 賢一郎
(Nan-ya, Ken-ichiro)

2014年3月

シスプラチン誘発ラット腎障害マーカーとしての尿中
kidney injury molecule-1 (Kim-1) の有用性

Usefulness of urinary kidney injury molecule-1 (Kim-1)
as a biomarker for cisplatin-induced kidney injury
in rats

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である。

2014年3月
(March, 2014)

静岡県立大学大学院 薬学研究科
衛生分子毒性学講座

南谷 賢一郎
Nan-ya, Ken-ichiro

略語表

AKI:	Acute kidney injury
α -GST:	α -Glutathione <i>S</i> -transferase
α -SMA:	α -Smooth muscle actin
BUN:	Blood urea nitrogen
CDDP:	<i>cis</i> -Diamine dichloroplatinum
EMA:	European Medicines Agency
FDA:	U.S. Food and Drug Administration
GSTYb1:	Glutathione- <i>S</i> -transferase Yb1
H&E:	Hematoxylin and Eosin
Kim-1:	Kidney injury molecule-1
L-FABP:	Liver-type fatty acid binding protein
NAG:	<i>N</i> -acetyl- β - <i>D</i> -glucosaminidase
NGAL:	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
PMDA:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan
PSTC:	Predictive Safety Testing Consortium
RPA-1:	Renal papillary antigen-1
SCr:	Serum creatinine
TFF3:	Trefoil factor 3

目次

略語表

緒言.....	1
第一章 シスプラチン単回投与誘発ラット急性腎障害の早期検出に有用な尿中バイオマーカーの探索	
第一節 序論.....	4
第二節 実験方法.....	4
1 試薬.....	4
2 動物及び飼育条件.....	4
3 腎障害の惹起.....	4
4 血中バイオマーカーの測定.....	5
5 尿中バイオマーカーの測定.....	5
6 病理組織学的検査.....	5
7 統計学的解析.....	5
第三節 結果.....	6
1 血中バイオマーカーの測定.....	6
2 尿中バイオマーカーの測定.....	7
3 病理組織学的検査.....	10
第四節 考察.....	13
第二章 シスプラチン反復投与誘発ラット腎障害の早期検出や病変進展をモニター可能な尿中バイオマーカーの探索	
第一節 序論.....	16
第二節 実験方法.....	16
1 試薬.....	16
2 動物及び飼育条件.....	16
3 腎障害の惹起.....	16

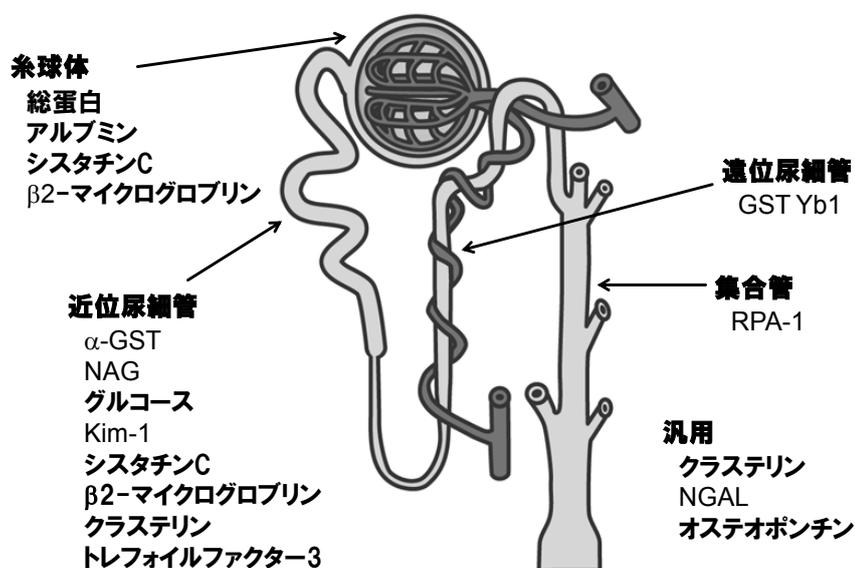
4	血中バイオマーカーの測定.....	18
5	尿中バイオマーカーの測定.....	18
6	病理組織学的検査.....	18
7	統計学的解析.....	18
第三節	結果.....	19
	実験モデル 1.....	19
	実験モデル 2.....	25
	実験モデル 3.....	30
第四節	考察.....	31
総括.....		34
謝辞.....		35
引用文献.....		36

緒言

腎臓は、その機能や構造の特徴から薬剤の影響を受けやすい臓器の一つであり、薬剤誘発性腎障害を早期に検出や診断することは、重篤な副作用の回避や適切な薬剤治療に重要である。現在、非臨床試験や臨床での腎障害の検出には血中尿素窒素

(BUN) や血清クレアチニン (SCr) がバイオマーカーとして汎用されているが、どちらのバイオマーカーも腎障害に対する検出感度が低く、腎機能が 50%程度低下して初めて変動が認められる。¹⁻³⁾ また、BUN や SCr は腎臓以外の障害や、食事、脱水、栄養状態等の生理的な変動によっても影響を受けるため特異性も十分とはいえない。^{2, 4-6)} こうしたことから腎障害を早期かつ特異的に検出可能なバイオマーカーが望まれている。腎障害の検出には尿検査も汎用され、尿蛋白、尿糖、潜血等が測定されている。非侵襲的に尿を回収できることが尿検査の利点として挙げられる。

そのような背景のもと、2006年に Critical Path Institute により設立された安全性予測試験コンソーシアム (PSTC) の腎毒性作業部会では 23 種のラットの尿中腎障害バイオマーカーについて検討され、7 種 (Kim-1、アルブミン、クラスτεリン、TFF3、総蛋白、シスタチン C、 β 2-マイクログロブリン) の尿中腎障害バイオマーカーの有用性が示された。⁷⁻¹⁰⁾ PSTC から推奨された 7 種のバイオマーカーに関しては、2007 年に米国食品医薬品局 (FDA) と欧州医薬品庁 (EMA)、2010 年に医薬品医療機器総合機構 (PMDA) においてその適格性が確認され、既存の腎障害バイオマーカー (BUN、SCr) との併用使用を前提として、非臨床試験におけるラットの急性腎障害 (AKI) を検出する際の付加的な情報を与えるバイオマーカーとしての有用性が認められた。主な尿中腎障害バイオマーカー (PSTC 推奨の 7 種を含む) のネフロンにおける部位特異性を以下に記した。



PSTC の報告以降、尿中腎障害バイオーカーに関する研究が精力的に行われ、PSTC 推奨の 7 種の尿中バイオーカー以外にも、ラット AKI の検出において α -GST、NGAL、vanin-1、オステオポンチン等の尿中バイオーカーの有用性が報告されている。¹¹⁻¹⁷⁾ また、尿中 Kim-1、クラステリン、シスタチン C、NGAL は、ラットに腎障害物質を反復投与することにより惹起される亜急性腎障害の検出に対しても有用性を示唆する結果が示されている。^{13, 17-19)} しかしながら、腎障害物質の反復投与による亜急性から慢性の腎障害の発症や病変進展過程において、腎臓の病理組織学的変化と尿中バイオーカー変動との関連性を詳細に解析した報告は存在しない。PSTC から PMDA に提出された薬剤誘発性急性腎障害に係るバイオーカー相談においても、PMDA からは慢性的な腎障害の評価にあたって AKI のバイオーカーが有用であるか否かの検証や、腎臓における病変が出現するまで並びに病変が消失又は回復するまでの尿中バイオーカー変動を評価する必要性が求められている。²⁰⁾

そこで、本研究では、これまで報告されているラット AKI に対する代表的な尿中バイオーカーを用いて、薬剤の反復投与により惹起される亜急性から慢性腎障害の早期検出や病変の進展をモニター可能なバイオーカーを探索した。

腎障害を惹起する薬剤には、ヒト、動物共に腎臓の近位尿細管に障害を起こすことが知られている抗悪性腫瘍薬のシスプラチン (CDDP) を用いた。シスプラチンは多くの腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果が示されている半面、様々な副作用を有し、特に腎毒性はシスプラチンの用量制限因子となる。シスプラチン投与により近位尿細管の直部 (S3) の尿細管上皮細胞に障害が認められ、その腎毒性発現にはアポトーシスや酸化ストレスの関与が示唆されている。^{21, 22)} 通常、シスプラチンによる腎障害は一過性であり、障害された尿細管上皮細胞は修復・再生されるが、²³⁾ ラットにシスプラチンを反復投与することにより慢性的な腎障害が惹起されることが報告されている。^{24, 25)}

第一章では、ラットにシスプラチンを単回静脈内投与することにより AKI を惹起し、従来の血中バイオーカー (BUN、SCr)、ラット AKI の検出に有用性が報告されている代表的な尿中バイオーカー (アルブミン、グルコース、Kim-1、NGAL、オステオポンチン) 及び腎臓の病理組織学的変化を経時的に解析することで、シスプラチン誘発ラット AKI に対する尿中バイオーカーの有用性を確認した。第二章では、単回投与では腎障害が認められない用量のシスプラチンを異なる 2 通りの投与スケジュールでラットに反復静脈内投与して亜急性から慢性腎障害を惹起した。そして、AKI の評価に推奨されている尿中バイオーカー (アルブミン、クラステリン、グルコース、Kim-1、NGAL、オステオポンチン) を経時的に測定し、腎臓の病理組織学的変化や従来の血中バイオーカー (BUN、SCr) 変動との関連性を追求することにより、AKI に対して有用な尿中バイオーカーはシスプラチンによる亜急性から慢性腎障害の早期検出や病変の進展をモニター出来るか否かを検証した。さらに、尿中バイオーカーが変動した時点でシスプラチンの投与を中止し、その後のバイオーカー

一変動や病変をモニターすることにより、重篤な副作用の回避や適切な薬剤治療のバイオマーカーとしての尿中バイオマーカーの有用性を検証した。

第一章 シスプラチン単回投与誘発ラット急性腎障害の早期検出に有用な尿中バイオマーカーの探索

第一節 序論

本章においては、ラットにシスプラチンを単回静脈内投与することで AKI を惹起し、AKI の検出に推奨されている尿中バイオマーカー、従来の血中バイオマーカー（BUN、SCr）及び腎臓の病理組織学的変化を経時的に解析することにより、シスプラチン単回投与誘発 AKI に対する尿中バイオマーカーの有用性を確認した。

第二節 実験方法

1. 試薬

腎障害惹起物質にはシスプラチン製剤（ランダ注[®]、日本化薬、東京）、媒体には生理食塩液（大塚製薬工場、徳島）を使用した。使用時、シスプラチン製剤（原液 0.5 mg/mL）を生理食塩液で希釈し、目的とする濃度に調製した。

2. 動物及び飼育条件

5 週齢の雄性 Crl:CD (SD) ラットを日本チャールスリバー（厚木）より購入した。動物入荷後、検疫と馴化を兼ねて飼育し、6 週齢で使用した。動物はステンレス製ラット用ハンガーケージ（260 W×360 D×187 H mm、トキワ科学器械、東京）に収容した。検疫・馴化期間中は 1 ケージあたり 5～6 匹収容し、群編成後は 1 ケージあたり 1 匹収容した。動物は温度 19～25°C（管理範囲）、相対湿度 30～70%（管理範囲）、換気回数 15 回/時間以上（管理範囲）、照明時間 12 時間（7～19 時）のバリエーションシステムの飼育室で飼育した。動物には放射線照射により滅菌処理した製造後 6 ヶ月以内のマウス・ラット用固型飼料 FR-2 10kGy（船橋農場、千葉）をステンレス製給餌器（トキワ科学器械）に充填し、自由に摂取させた。また、水は、水道水を 5 μm フィルターで濾過し、自動給水ノズルを用いて動物に自由に摂取させた。なお、代謝ケージに収容した場合はプラスチック製給水瓶に水を充填し自由に摂取させた。動物の群編成は検疫・馴化期間終了時の体重を基に層別無作為抽出法を用いて各群の平均体重値がほぼ等しくなるように振り分けた。協和発酵キリン株式会社「動物実験規定」を遵守して動物実験を行った。

3. 腎障害の惹起

ラットにシスプラチン又は生理食塩液を約 0.1 mL/秒の速度で、ディスポーザブル注射筒（フチガミ器械店、京都）と翼付静注針（25G、テルモ、東京）を用いて単回静脈内投与した。投与容量は動物の体重 100 g あたり 0.5 mL とし、投与前の体重測

定値を基に算出した。シスプラチンの用量は、1、2.5 及び 5 mg/kg として、Day 2、4、7、10 及び 14 (Day 10 及び 14 は 5 mg/kg のみ) にラットを解剖した。対照群には生理食塩液を単回静脈内投与して Day 7 又は Day 14 に解剖した。なお、シスプラチン又は生理食塩液投与日を Day 1 とした。

4. 血中バイオマーカーの測定

約 16 時間の絶食条件下、イソフルラン (マイラン製薬、東京) を用いて動物を麻酔し、後大静脈より 1.5 mL 以上採血した。採取した血液を遠心分離 (1710×g、10 分間、4°C、KUBOTA5920、久保田商事、東京) して、血清を得、自動分析装置 (H7170S、日立製作所、東京) を用いて BUN (Urease-Leucine dehydrogenase method) 及び SCr (CRN-SOX-POD method) を測定した。

5. 尿中バイオマーカーの測定

動物をラット用代謝ケージ (トキワ科学器械) に収容して解剖日の前日夕方から絶食条件下において約 16 時間採尿した。採取した尿は遠心分離 (400×g、5 分間、KUBOTA5920、久保田商事) して上清を得た。自動分析装置 (H7070、日立製作所) を用いてクレアチニン (CRN-SOX-POD method) 及びグルコース (Glck・G6PDH method) を測定した。また、Multi-Array[®] assay system (Meso Scale Discovery、Rockville、MD) を用いてアルブミン、Kim-1、NGAL 及びオステオポンチン (Kidney injury panel 1 (rat) assay kit) を測定した。

なお、尿量を用いて尿中バイオマーカーの尿中総排泄量を算出した。

6. 病理組織学的検査

解剖日の採血終了後、イソフルラン麻酔下にて放血致死させた。腎臓を採取して、10vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定終了後、常法に従ってパラフィン包埋ブロックおよびヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色標本を作製し、光学顕微鏡下で観察した。

7. 統計学的解析

実施しなかった。

第三節 結果

1. 血中バイオマーカーの測定

血中バイオマーカーの結果を Table 1 に示した。

シスプラチン 5 mg/kg の単回投与により Day 4 から BUN や SCr の高値が認められ (Day 7 の対照群比 : 2.1 及び 2.4 倍)、Day 14 においても高値を維持した

(Day 14 の対照群比 : 共に 1.9 倍)。シスプラチン 1 及び 2.5 mg/kg の単回投与では BUN や SCr の明らかな変動は認められなかった。

Table 1. The changes in the levels of serum biomarkers in the rats treated with a single treatment of CDDP

Treatment (mg/kg)	Day	BUN (mg/dL)	SCr (mg/dL)
Saline	7	11.6 ± 2.6 (3) ^a	0.20 ± 0.03 (3)
	14	11.8 ± 1.1 (3)	0.19 ± 0.01 (3)
CDDP (1)	2	11.2 ± 0.9 (3)	0.19 ± 0.02 (3)
	4	9.4 ± 0.9 (3)	0.19 ± 0.02 (3)
	7	10.7 ± 1.2 (3)	0.20 ± 0.00 (3)
CDDP (2.5)	2	10.9 ± 0.9 (3)	0.19 ± 0.02 (3)
	4	13.9 ± 5.9 (3)	0.27 ± 0.09 (3)
	7	10.4 ± 0.7 (3)	0.19 ± 0.02 (3)
CDDP (5)	2	12.5 ± 0.4 (3)	0.21 ± 0.01 (3)
	4	24.8 ± 6.9 (3)	0.48 ± 0.05 (3)
	7	26.3 ± 6.4 (3)	0.47 ± 0.07 (3)
	10	21.3 ± 4.9 (3)	0.37 ± 0.04 (3)
	14	22.8 ± 9.8 (3)	0.36 ± 0.08 (3)

^aThe numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined.

The data of each biomarker examined present the mean ± SD.

The day of administration is defined as Day 1.

2. 尿中バイオマーカーの測定

尿中バイオマーカーの結果を Table 2 及び Table 3 に示した。

シスプラチン 5 mg/kg の単回投与では、Day 2 においてアルブミン及び Kim-1 排泄量の増加が認められた（対照群比：5.9 及び 2.2 倍）。アルブミン排泄量は Day 4 に最大値となり（対照群比：90.7 倍）、Day 7 においても高値であった（対照群比：20.3 倍）。Kim-1 排泄量は Day 7（対照群比：33.2 倍）まで経時的に増加し、その後排泄量は減少するものの Day 14 においても高値を維持した（対照群比：18.0 倍）。グルコース排泄量は Day 4 に一過性に著明に増加した。オステオポンチン排泄量は Day 7 に増加し（対照群比：12.5 倍）、Day 14 においても高値を維持していた（対照群比：8.1 倍）。試験期間中、クレアチニン排泄量の低値傾向が認められた（Table 2）。

シスプラチン 2.5 mg/kg の単回投与では、Day 2 において Kim-1 排泄量の明らかな増加が認められた（対照群比：7.3 倍）。Kim-1 排泄量は Day 4 でさらに増加し（対照群比：26.0 倍）、Day 7 でも高値を維持していた（対照群比：26.6 倍）。また、Day 4 ではアルブミン排泄量が一過性に増加した（対照群比：69.0 倍）（Table 3）。

シスプラチン 1 mg/kg の単回投与では Kim-1 排泄量の軽度増加が認められたが、その他の尿中バイオマーカーの明らかな変動は認められなかった（Table 3）。

Table 2. The changes in the levels of urinary biomarkers in the rats treated with a single treatment of CDDP (5 mg/kg)

Biomarkers (Amount/16 h-urine)	Treatment	Day 2	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
Albumin (mg)	Saline	NT	NT	NT	NT	0.08 ± 0.02 (3)
	CDDP	0.47 ± 0.36 (3) ^a	6.95 ± 1.19 (3)	1.41 ± 0.85 (3)	0.23 ± 0.13 (3)	0.23 ± 0.09 (3)
Creatinine (mg)	Saline	NT	NT	NT	NT	4.14 ± 0.74 (3)
	CDDP	3.74 ± 0.79 (3)	3.08 ± 0.49 (3)	3.85 ± 0.26 (3)	2.85 ± 0.34 (3)	3.08 ± 0.07 (3)
Glucose (g)	Saline	NT	NT	NT	NT	0 (3)
	CDDP	0 (3)	37.2 ± 4.4 (3)	1.4 ± 1.2 (3)	0 (3)	0 (3)
Kim-1 (ng)	Saline	NT	NT	NT	NT	8.40 ± 2.08 (3)
	CDDP	17.71 ± 9.65 (3)	147.63 ± 32.56 (3)	230.12 ± 61.18 (3)	214.80 ± 125.10 (3)	91.62 ± 30.90 (3)
NGAL (µg)	Saline	NT	NT	NT	NT	1.14 ± 0.57 (3)
	CDDP	1.16 ± 0.22 (3)	1.52 ± 0.45 (3)	4.44 ± 0.99 (3)	2.28 ± 0.18 (3)	2.36 ± 0.32 (3)
Osteopontin (ng)	Saline	NT	NT	NT	NT	7.92 ± 2.34 (3)
	CDDP	6.34 ± 1.14 (3)	16.70 ± 6.06 (3)	81.49 ± 37.11 (3)	42.22 ± 3.06 (3)	39.06 ± 13.26 (3)

The 16 h-urine samples were prepared from individual rats and used for the assays of the indicated biomarkers.

^a The numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined. The data of each biomarker examined present the mean ± SD.

The day of administration is defined as Day 1. NT: not tested

Table 3. The changes in the levels of urinary biomarkers in the rats treated with a single treatment of CDDP (1 and 2.5 mg/kg)

Biomarkers (Amount/ 16 h-urine)	Treatment (mg/kg)	Day 2	Day 4	Day 7
Albumin (mg)	Saline	NT	NT	0.10 ± 0.04 (3)
	CDDP (1)	0.09 ± 0.03 (3) ^a	0.27 ± 0.10 (3)	0.07 ± 0.05 (3)
	CDDP (2.5)	0.53 ± 0.30 (3)	6.90 ± 4.09 (3)	0.21 ± 0.15 (3)
Creatinine (mg)	Saline	NT	NT	4.50 ± 0.98 (3)
	CDDP (1)	3.71 ± 0.23 (3)	3.81 ± 0.86 (3)	3.54 ± 0.62 (3)
	CDDP (2.5)	3.93 ± 0.92 (3)	3.72 ± 1.31 (3)	3.73 ± 0.63 (3)
Glucose (g)	Saline	NT	NT	0.1 ± 0.2 (3)
	CDDP (1)	0.1 ± 0.6 (3)	0.1 ± 0.7 (3)	0.4 ± 0.3 (3)
	CDDP (2.5)	0.3 ± 0.2 (3)	18.5 ± 14.2 (3)	0.6 ± 0.8 (3)
Kim-1 (ng)	Saline	NT	NT	6.33 ± 1.25 (3)
	CDDP (1)	19.12 ± 10.67 (3)	12.51 ± 1.66 (3)	5.08 ± 4.54 (3)
	CDDP (2.5)	45.91 ± 15.07 (3)	164.51 ± 78.48 (3)	168.63 ± 129.14 (3)
NGAL (µg)	Saline	NT	NT	1.10 ± 0.37 (3)
	CDDP (1)	0.89 ± 0.30 (3)	1.24 ± 0.73 (3)	0.97 ± 0.62 (3)
	CDDP (2.5)	2.48 ± 1.55 (3)	1.77 ± 0.08 (3)	1.72 ± 0.12 (3)
Osteopontin (ng)	Saline	NT	NT	12.30 ± 2.15 (3)
	CDDP (1)	8.51 ± 5.28 (3)	9.60 ± 6.22 (3)	38.58 ± 25.83 (3)
	CDDP (2.5)	9.74 ± 1.61 (3)	5.24 ± 1.61 (3)	10.40 ± 5.92 (3)

The 16 h-urine samples were prepared from individual rats and used for the assays of the indicated biomarkers.

^a The numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined. The data of each biomarker examined present the mean ± SD.

The day of administration is defined as Day 1. NT: not tested

3. 病理組織学的検査

腎臓の病理組織学的検査の結果を Fig. 1 及び Table 4 に示した。

シスプラチン 5 mg/kg を単回投与したラットでは、Day 4 に軽度から中等度の近位尿細管上皮細胞の変性（空胞化、壊死、脱落）、ごく軽度の尿円柱形成及び間質の炎症細胞浸潤が認められた。Day 7 では病変は進展し、重度の近位尿細管上皮細胞の変性（空胞化、壊死、脱落）、中等度の尿円柱形成及び間質への炎症細胞浸潤が認められ、加えて近位尿細管上皮細胞の再生性変化（軽度）も出現した。Day 7 で認められた所見は Day 14 でも確認されたが、Day 7 と比べると病変の程度は弱いことから、本モデルの病変のピークは Day 7 から Day 10 と考えられた。

シスプラチン 2.5 mg/kg を単回投与したラットでは、Day 4 にごく軽度の近位尿細管上皮細胞の変性（空胞化、壊死、脱落）、Day 7 ではごく軽度から軽度の近位尿細管上皮細胞の変性（空胞化、壊死、脱落）、ごく軽度の間質への炎症細胞浸潤及び近位尿細管上皮細胞の再生性変化が認められた。

シスプラチン 1 mg/kg の単回投与では腎臓の病理組織学的変化は認められなかった。

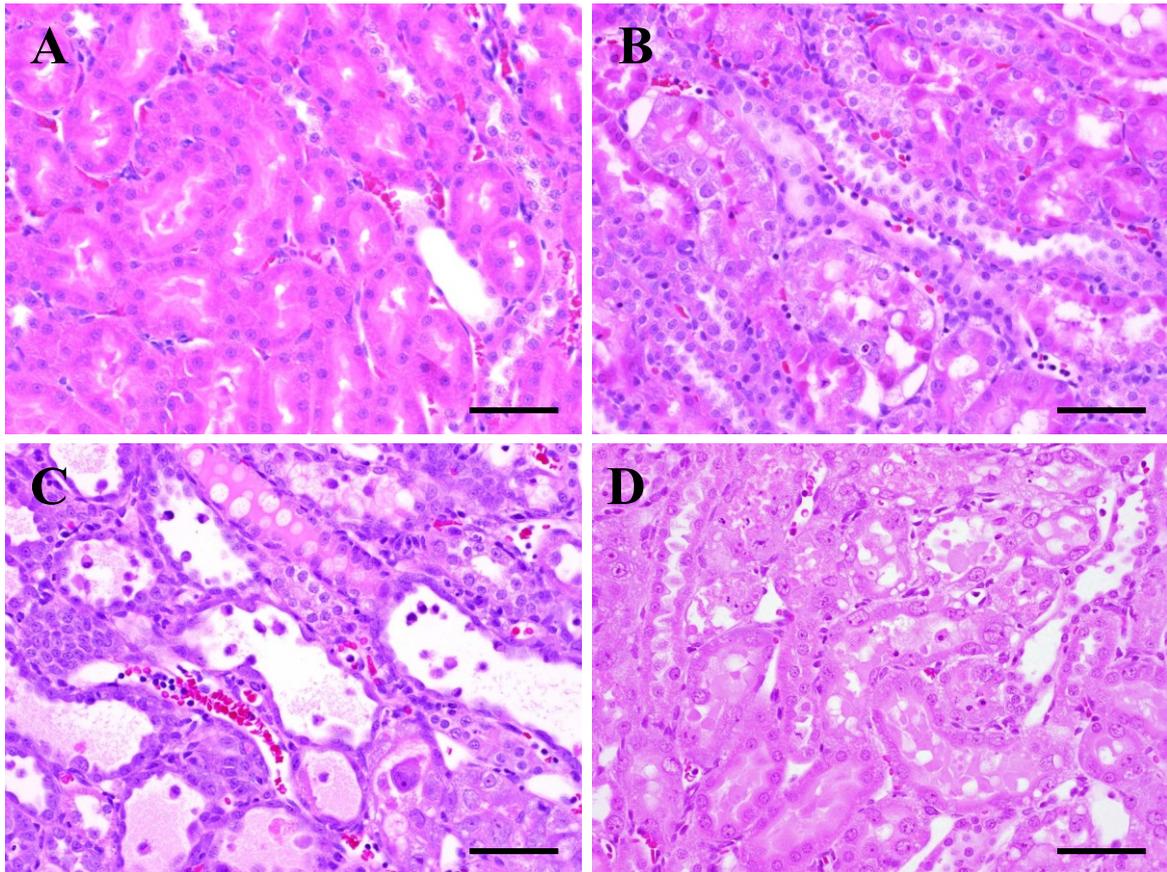


Fig. 1. Representative photomicrographs of renal tissues from the rats treated with CDDP at a dose of 5 mg/kg (B and C) or 2.5 mg/kg (D). The tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. No clear changes are observed in the saline-treated rats (A). At 5 mg/kg of CDDP, moderate degeneration (vacuolization, necrosis and desquamation) of the proximal tubular epithelial cells, very slight urinary cast formation and interstitial inflammatory cell infiltration were observed on Day 4 (B). On Day 7 (C) the kidneys showed progression of the lesions observed on Day 4, regeneration of proximal tubular was also observed. At 2.5 mg/kg of CDDP, very slight degeneration (vacuolization, necrosis and desquamation) was observed on Day 7 (D). Scale bar: 50 μ m.

Table 4. Histopathological changes of renal tissues from the rats treated with a single treatment of CDDP

Findings	Saline	CDDP (1 mg/kg)			CDDP (2.5 mg/kg)			CDDP (5 mg/kg)				
		Day 2	Day 4	Day 7	Day 2	Day 4	Day 7	Day 2	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
Degeneration (vacuolization, necrosis, desquamation) of proximal tubular epithelium	—	—	—	—	—	± (3/3) ^a	± (2/3) + (1/3)	—	+ (1/3) 2+ (2/3)	3+ (3/3)	+ (1/3) 2+ (1/3) 3+ (1/3)	+ (1/3) 2+ (2/3)
Regeneration of proximal tubular epithelium	—	—	—	—	—	—	± (2/3)	—	—	+ (3/3)	± (1/3) + (2/3)	± (1/3) + (2/3)
Urinary cast formation	—	—	—	—	—	—	—	—	± (2/3)	2+ (3/3)	± (1/3) + (2/3)	± (3/3)
Interstitial inflammatory cell infiltration	—	—	—	—	—	—	± (2/3)	—	± (2/3)	2+ (3/3)	+ (1/3) 2+ (2/3)	± (1/3) + (2/3)

Histopathological grade: -, no change; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe

^a The numbers shown in parentheses represent the number of animals with findings/number of animals examined.

The day of administration is defined as Day 1.

第四節 考察

近年、ラット AKI に対する尿中バイオマーカーの探索が精力的に行われており、従来の血中バイオマーカー (BUN、SCr) と比較して尿中バイオマーカーの有用性が数多く報告されている。^{3, 5, 26)}

本章では、ラットにシスプラチンを単回静脈内投与することにより AKI を惹起し、血中バイオマーカー (BUN、SCr)、AKI に対して有用性が示されている尿中バイオマーカー及び腎臓の病理組織学的変化を経時的に解析し、シスプラチンにより誘発されるラット AKI の検出に有用な尿中バイオマーカーを探索した。

シスプラチン 5 mg/kg を単回静脈内投与したラットの腎臓では、Day 4 に近位尿細管上皮細胞の変性、尿円柱形成及び間質の炎症細胞浸潤が認められた。Day 7 や Day 10 では病変は進展し、Day 14 では病変の回復傾向が認められた。BUN や SCr は Day 4 から増加し、その後 Day 14 まで高値を維持したが、対照群に対する変動率は最大でも約 2.5 倍であった。

シスプラチン 5 mg/kg を単回静脈内投与時の各種尿中腎障害バイオマーカーの対照群 (Day 14) に対する変動率を Table 5 に示した。

Table 5. The fluctuation ratio of the levels of urinary biomarkers in the rats treated with a single dose of CDDP (5 mg/kg)

Biomarkers	Day 2	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
Albumin	5.9	90.7	20.3	3.7	4.5
Glucose ^a	0	37.2	1.4	0	0
Kim-1	2.2	19.4	33.2	34.5	18.0
NGAL	1.0	1.3	3.9	2.0	2.1
Osteopontin	0.9	2.3	12.5	7.3	8.1

The values except glucose are presented as the mean fold increase in each biomarker level of the CDDP-treated rats, relative to the saline-treated rats.

^aThe value of glucose is presented as the measured value (g/16 hr).

The day of administration is defined as Day 1.

シスプラチン 5 mg/kg の単回静脈内投与により、尿中 Kim-1 及びアルブミン排泄量は、腎臓の病理組織学的変化や血中バイオマーカーの変動に先立って Day 2 から 2 倍以上の増加が認められた。Day 4 にはどちらのマーカーの排泄量も著明に増加し、それらの増加率は BUN や SCr の増加率と比して非常に高いことから、尿中 Kim-1 及びアルブミン排泄量はシスプラチンによる AKI を早期かつ高感度に検出できることを確認した。また、Kim-1 排

泄量の増加のピークは、最も腎病変が重篤であった Day 7 から Day 10 と一致することから、尿中 Kim-1 排泄量はシスプラチンにより惹起される AKI の病変を反映するバイオマーカーになることが示された。

シスプラチン 2.5 mg/kg を単回静脈内投与したラットの腎臓では、Day 4 及び Day 7 にごく軽度又は軽度の近位尿細管上皮細胞の変性や間質への炎症細胞浸潤が認められた。BUN 及び SCr は Day 7 まで明らかな変動は見られなかったのに対し、アルブミン及び Kim-1 排泄量は Day 2 から増加し、アルブミン排泄量は Day 4、Kim-1 排泄量は Day 4 及び 7 に著明に増加した。さらに、Kim-1 排泄量は腎臓に病理組織学的変化が認められないシスプラチン 1 mg/kg 投与においても増加傾向が伺われた。

Kim-1 は腎尿細管の上皮細胞に発現しているフォスファチジルセリン受容体であり、アポトーシスを起こした細胞の表面に表出される eat-me シグナルに対する受容体として作用することで腎近位尿細管細胞による尿細管内腔に存在するアポトーシス細胞の除去に寄与していると考えられている。²⁷⁾ 正常の腎臓では Kim-1 の発現量は非常に少ないが、腎障害時には近位尿細管細胞において著明に発現が亢進する。また、近位尿細管障害時にはマトリックスメタロプロテアーゼにより Kim-1 の細胞外ドメインが切断され、尿中に排出されることが知られており、^{10, 28)} 多くの薬剤や環境物質により惹起されるラット AKI において尿中に早期に感度よく検出されることが報告されている。^{26, 29-32)} 既存の報告と同様、本検討においても尿中 Kim-1 はシスプラチン誘発 AKI の検出に優れたバイオマーカーになることを確認した。

アルブミンは主要な血清タンパクである。正常の腎臓では、アルブミンの一部は糸球体から濾過されるが、近位尿細管上皮細胞で再吸収されるため尿中にはほとんど排泄されない。しかし、腎障害時には、糸球体濾過量と尿細管での再吸収量のバランスが破綻することにより尿中のアルブミン排泄量が増加する。このように腎障害による尿中アルブミン排泄量の増加の機序を考える際、アルブミンの糸球体濾過量の増加と尿細管上皮細胞での再吸収量の低下の両面を考える必要がある。本研究では糸球体に明らかな病理組織学的変化は認められなかった。従って、シスプラチン単回投与により認められた尿中アルブミン排泄量の増加は、過剰量のシスプラチンの投与により直接的に尿細管上皮細胞が障害され、その結果、尿細管におけるアルブミンの再吸収能が低下したことが原因と考えられ、尿中アルブミン排泄量はシスプラチン誘発 AKI の有用なバイオマーカーになることを示した。

Kim-1 やアルブミン以外のマーカーでは、シスプラチンの 5 mg/kg 投与により尿中グルコース排泄量が一過性 (Day 4) に著明に増加した。通常、グルコースは糸球体で濾過され、ほとんど全量が尿細管上皮細胞で再吸収される。従って、アルブミンと同様、シスプラチンによる尿細管障害によってグルコースの再吸収能が低下した結果、尿中のグルコース排泄量が増加したと考えられた。しかし、尿中グルコース排泄量の増加はアルブミンより遅れて出現すること、また極めて一過性の変化であることから、シスプラチンによる AKI の検出にはアルブミンより劣ると考えられた。その他、今回測定した尿中バイオマーカーに関しては、NGAL は明らかな変動は認められず、オステオポンチンは Day 7 以降に増加することから、

どちらのマーカーもシスプラチンによるラット AKI の検出の点では有用性が低いと判断した。

以上、本章では、シスプラチンにより誘発されるラット AKI において、尿中アルブミン及び Kim-1 排泄量は従来の血中バイオマーカーよりも早期に腎障害を検出できることを示した。特に、尿中 Kim-1 は、腎臓の病理組織学的変化が軽度又は認められない用量から変動すること、病変の進展や回復をモニターできる可能性が示されたことから、今回測定したバイオマーカーの中では、シスプラチンによるラット AKI の検出に対して最も優れたバイオマーカーになることを確認した。

第二章 シスプラチン反復投与誘発ラット腎障害の早期検出や病変進展をモニター可能な尿中バイオマーカーの探索

第一節 序論

第一章では、従来の血中バイオマーカーと比較して尿中 Kim-1 及びアルブミン排泄量は、シスプラチン単回投与によるラット AKI を早期に検出できることを示した。

本章では、単回投与では腎障害が認められない用量のシスプラチンを異なる 2 通りの投与スケジュールでラットに反復静脈内投与して亜急性から慢性腎障害を惹起した。そして、AKI の評価に推奨されている尿中バイオマーカーを経時的に測定し、腎臓の病理組織学的変化や血中バイオマーカー (BUN、SCr) 変動との関連性を追求することにより、AKI に対して有用な尿中バイオマーカーはシスプラチンによる亜急性から慢性腎障害の早期検出や病変の進展をモニター出来るか否かを検証した。さらに、尿中バイオマーカーが変動した時点でシスプラチンの投与を中止し、その後のバイオマーカー変動や病変をモニターすることにより、重篤な副作用の回避や適切な薬剤治療のバイオマーカーとしての尿中バイオマーカーの有用性を検証した。

第二節 実験方法

1. 試薬

第一章と同じ試薬を使用した。

2. 動物及び飼育条件

第一章と同週齢のラットを購入し、同一の飼育条件でラットを飼育した。

3. 腎障害の惹起

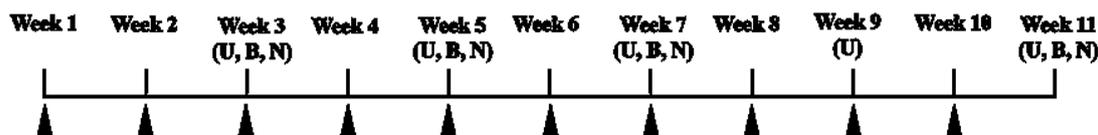
3 種の試験 (実験モデル 1、2 及び 3) を実施した。実験モデル 1 ではシスプラチンの反復投与による腎障害の病変進展をモニター可能な尿中バイオマーカーの探索、実験モデル 2 及び 3 ではシスプラチンの反復投与による腎障害の早期検出や障害の進展を予測する上で有用な尿中バイオマーカーの探索を目的として試験デザインを立案した。各試験のデザインを Fig. 2 に示した。初回投与日及び初回投与週をそれぞれ Day 1 及び Week 1 とし、実験モデル 3 では初回投与の前週を Week 0 とした。

シスプラチン又は生理食塩液を約 0.1 mL/秒の速度で、ディスポーザブル注射筒 (フチガミ器械店) と翼付静注針 (25G、テルモ) を用いてラットに反復静脈内投与して腎障害を惹起した。投与容量は動物の体重 100 g あたり 0.5 mL とし、投与前の体重測定値を基に算出した。1 回あたりのシスプラチンの用量は、単回投与では明らかな腎障害が認められず、反復投与により腎障害が惹起されると予想される 1.5 mg/kg を設定した。

Experimental model 1 (four daily dose of CDDP or saline)



Experimental model 2 (ten weekly dose of CDDP or saline)



Experimental model 3 (four weekly dose of CDDP or saline)

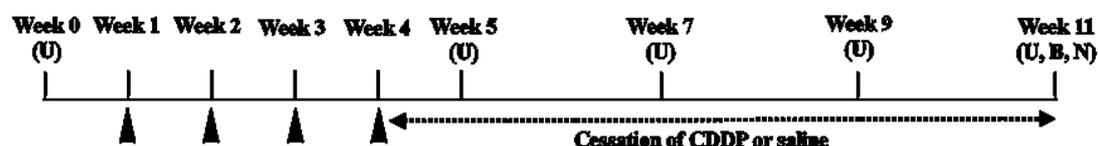


Fig. 2. The experimental models designated for development of CDDP-induced kidney injury.

The closed triangle represents the administration of CDDP or saline. The first day and the first week of administration are defined as Day 1 and Week 1, respectively. The just one week before the first administration is defined as Week 0. The symbols, such as U, B, and N, in parentheses mean urine collection, blood collection, and necropsy, respectively.

実験モデル 1

シスプラチン 1.5 mg/kg/day をラットに 1 日 1 回 4 日間静脈内投与した。対照群には生理食塩液を 4 日間静脈内投与した。尿サンプルは、Day 2、3、4、5、19 及び 33 に非絶食条件下で約 16 時間採尿した。4 日間投与翌日 (Day 5) 及び Day 33 にラットを採血、解剖した。

実験モデル 2

シスプラチン 1.5 mg/kg/week をラットに週 1 回最長 10 週間静脈内投与した。対照群には生理食塩液を週 1 回 10 週間静脈内投与した。尿サンプルは、シスプラチン又は生理食塩液を 2、4、6、8 及び 10 回投与後 6 日目夕方から 7 日目朝まで絶食条件下で約 16 時間採取した。シスプラチン又は生理食塩液を 2、4、6 及び 10 回投与 7 日後に採血、解剖した。

実験モデル 3

シスプラチン 1.5 mg/kg/week をラットに週 1 回 4 週間静脈内投与後、シスプラチンの投与を中止し、7 週間休薬した。対照群には生理食塩液を週 1 回 4 週間静脈内投与した。尿サンプルは、初回投与の前週、シスプラチン又は生理食塩液 4 回投与後 1、3、5 及び 7 週に絶食条件下で約 16 時間採尿した。シスプラチン又は生理食塩液 4 回投与後、7 週間休薬時点でラットを解剖した。

4. 血中バイオマーカーの測定

非絶食条件下（実験モデル 1）又は約 16 時間の絶食条件下（実験モデル 2）、イソフルラン（マイラン製薬）を用いて動物を麻酔し、後大静脈より 1.5 mL 以上採血した。採取した血液を遠心分離（1710×g、10 分間、4°C、KUBOTA5920、久保田商事）して、血清を得、自動分析装置（H7170S、日立製作所）を用いて BUN（Urease-Leucine dehydrogenase method）、SCr（CRN-SOX-POD method）及びシスタチン C（LIT method）を測定した。

5. 尿中バイオマーカーの測定

動物をラット用代謝ケージ（トキワ科学器械）に収容して測定日の前日夕方から約 16 時間採尿した（実験 1 は非絶食、実験 2 及び 3 は絶食条件下）。採取した尿は遠心分離（400×g、5 分間、KUBOTA5920、久保田商事）して上清を得た。自動分析装置（H7070、日立製作所）を用いてクレアチニン（CRN-SOX-POD method）及びグルコース（Glck・G6PDH method）を測定した。また、Multi-Array[®] assay system（Meso Scale Discovery）を用いてアルブミン、Kim-1、NGAL 及びオステオポンチン（Kidney injury panel 1 (rat) assay kit）並びにクラステリン（Rat clusterin assay kit）を測定した。

なお、尿量より尿中バイオマーカーの総排泄量を算出した。

6. 病理組織学的検査

解剖日の採血終了後、イソフルラン麻酔下にて放血致死させた。腎臓を採取して、10vol%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定終了後、常法に従ってパラフィン包埋ブロックおよびヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色標本作製し、光学顕微鏡下で観察した。

7. 統計学的解析

シスプラチン投与群と生理食塩液投与群間での統計学的有意差の有無を、Student の *t* 検定による 2 群間検定により解析した。

第三節 結果

実験モデル 1 :

試験期間中、シスプラチンを投与したラットにおいて一般状態（外観、姿勢及び行動）の異常は認められなかった。シスプラチン投与群の試験期間中（Day 1～Day 33）の平均体重増加量は、生理食塩液投与群と比較して低値であった（生理食塩液：261.5 g、シスプラチン：169.8 g）

血中バイオマーカーの測定結果を Table 6 に示した。

シスプラチン 1.5 mg/kg を 4 日間反復静脈内投与した翌日（Day 5）において、BUN や SCr の有意な増加が認められた（対照群比：1.9 及び 2.2 倍）。BUN や SCr の増加は Day 33 でも Day 5 と同程度に認められた（対照群比：1.6 及び 1.5 倍）。

Table 6. The CDDP-induced changes in the levels of serum biomarkers in the rats examined in “Experimental model 1”

Day of blood collection	Treatment	BUN (mg/dL)	SCr (mg/dL)
Day 5	Saline	15.6 ± 1.5 (6) ^a	0.20 ± 0.01 (6)
	CDDP	29.7 ± 6.1* (6)	0.43 ± 0.08* (6)
Day 33	Saline	17.6 ± 0.8 (3)	0.26 ± 0.01 (3)
	CDDP	28.4 ± 5.5 (3)	0.40 ± 0.05* (3)

The “Days 5 and 33” are the serum collection days shown in Fig. 2.

^a The numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined.

The data of each biomarker examined present the mean ± SD.

*Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups: $P < 0.05$.

尿中バイオマーカーの測定結果を Table 7 及び Fig. 3 に示した。対照群と比較してシスプラチン投与群の Day 5 (4 回投与翌日) においてアルブミン、クラスτεリン、グルコース、Kim-1 及びオステオポンチン排泄量の有意な増加が認められた。特に、Kim-1 排泄量は Day 2 (シスプラチン 1 回投与) から有意に増加し (対照群と比較して 5.7 倍)、投与回数の増加に伴って増加した。さらに、2/3 例のラットにおいては Day 19 及び 33 の Kim-1 は Day 5 よりも高値を示した。上記した 2 例のラットでは、クラスτεリン及びオステオポンチンも Day 5 と比較して Day 19 及び 33 に明らかに排泄量が増加した。

対照群及びシスプラチン投与群の尿中クレアチニン排泄量は、Day 5 と比較して Day 19 及び 33 で増加した。血中クレアチニン量は筋肉量と相関することが知られている。²⁾ 本変化はラットの成長に伴った増加と考えられた。

Table 7. The CDDP-induced changes in the levels of urinary biomarkers in the rats examined in “Experimental model 1”

Biomarkers (Amount/16 h-urine)	Treatment	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 19	Day 33
Albumin (mg)	Saline	1.10 ± 0.82 (6) ^a	0.78 ± 0.33 (6)	0.83 ± 0.28 (6)	0.64 ± 0.35 (6)	5.94 ± 3.15 (3)	4.24 ± 2.88 (3)
	CDDP	0.83 ± 0.31 (6)	0.77 ± 0.20 (6)	8.71 ± 9.80 (6)	37.90 ± 17.94* (6)	10.17 ± 6.89 (3)	7.40 ± 3.05 (3)
Clusterin (µg)	Saline	0.09 ± 0.04 (6)	0.11 ± 0.08 (6)	0.09 ± 0.04 (6)	0.12 ± 0.10 (6)	0.14 ± 0.04 (3)	0.22 ± 0.06 (3)
	CDDP	0.06 ± 0.02 (6)	0.07 ± 0.02 (6)	0.10 ± 0.06 (6)	0.57 ± 0.28* (6)	2.81 ± 2.32 (3)	3.07 ± 2.80 (3)
Creatinine (mg)	Saline	2.54 ± 0.53 (6)	2.44 ± 0.31 (6)	2.54 ± 0.47 (6)	2.86 ± 0.08 (6)	6.58 ± 1.58 (3)	10.27 ± 2.30 (3)
	CDDP	2.39 ± 0.71 (6)	1.76 ± 0.48* (6)	1.74 ± 0.72 (6)	2.03 ± 0.81 (6)	6.03 ± 0.53 (3)	8.53 ± 0.81 (3)
Glucose (g)	Saline	1.37 ± 0.69 (6)	1.52 ± 0.11 (6)	1.63 ± 0.23 (6)	1.36 ± 0.56 (6)	2.09 ± 0.63 (3)	3.93 ± 3.28 (3)
	CDDP	1.41 ± 0.47 (6)	1.13 ± 0.27* (6)	2.11 ± 0.85 (6)	31.19 ± 17.95* (6)	3.60 ± 2.21 (3)	1.71 ± 0.86 (3)
Kim-1 (ng)	Saline	3.44 ± 1.34 (6)	3.04 ± 0.25 (6)	3.05 ± 0.83 (6)	3.65 ± 0.06 (6)	2.61 ± 4.52 (3)	2.85 ± 4.94 (3)
	CDDP	19.64 ± 7.04*** (6)	25.42 ± 10.51** (6)	27.31 ± 13.94** (6)	59.61 ± 37.65** (6)	98.93 ± 66.80 (3)	61.40 ± 43.99 (3)
NGAL (µg)	Saline	1.49 ± 0.75 (6)	1.23 ± 0.43 (6)	1.24 ± 0.60 (6)	1.04 ± 0.93 (6)	2.17 ± 3.75 (3)	2.13 ± 3.70 (3)
	CDDP	1.59 ± 0.77 (6)	1.26 ± 0.83 (6)	1.15 ± 0.70 (6)	2.01 ± 0.90 (6)	6.47 ± 4.23 (3)	6.58 ± 4.26 (3)
Osteopontin (ng)	Saline	11.46 ± 7.54 (6)	8.78 ± 1.47 (6)	9.72 ± 5.38 (6)	10.95 ± 3.57 (6)	10.26 ± 17.78 (3)	10.70 ± 18.54 (3)
	CDDP	9.08 ± 3.65 (6)	8.82 ± 4.19 (6)	8.57 ± 4.24 (6)	20.50 ± 6.90** (6)	97.27 ± 91.81 (3)	81.75 ± 83.44 (3)

The 16 h-urine was collected from each rat at the indicated schedule (Fig. 2) and used for the assays of the indicated biomarkers. The “Days” described are identified with those in “Experimental model 1” (Fig. 2).

^a The numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined. The value of each biomarker presents the mean ± SD.

*, **, *** Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

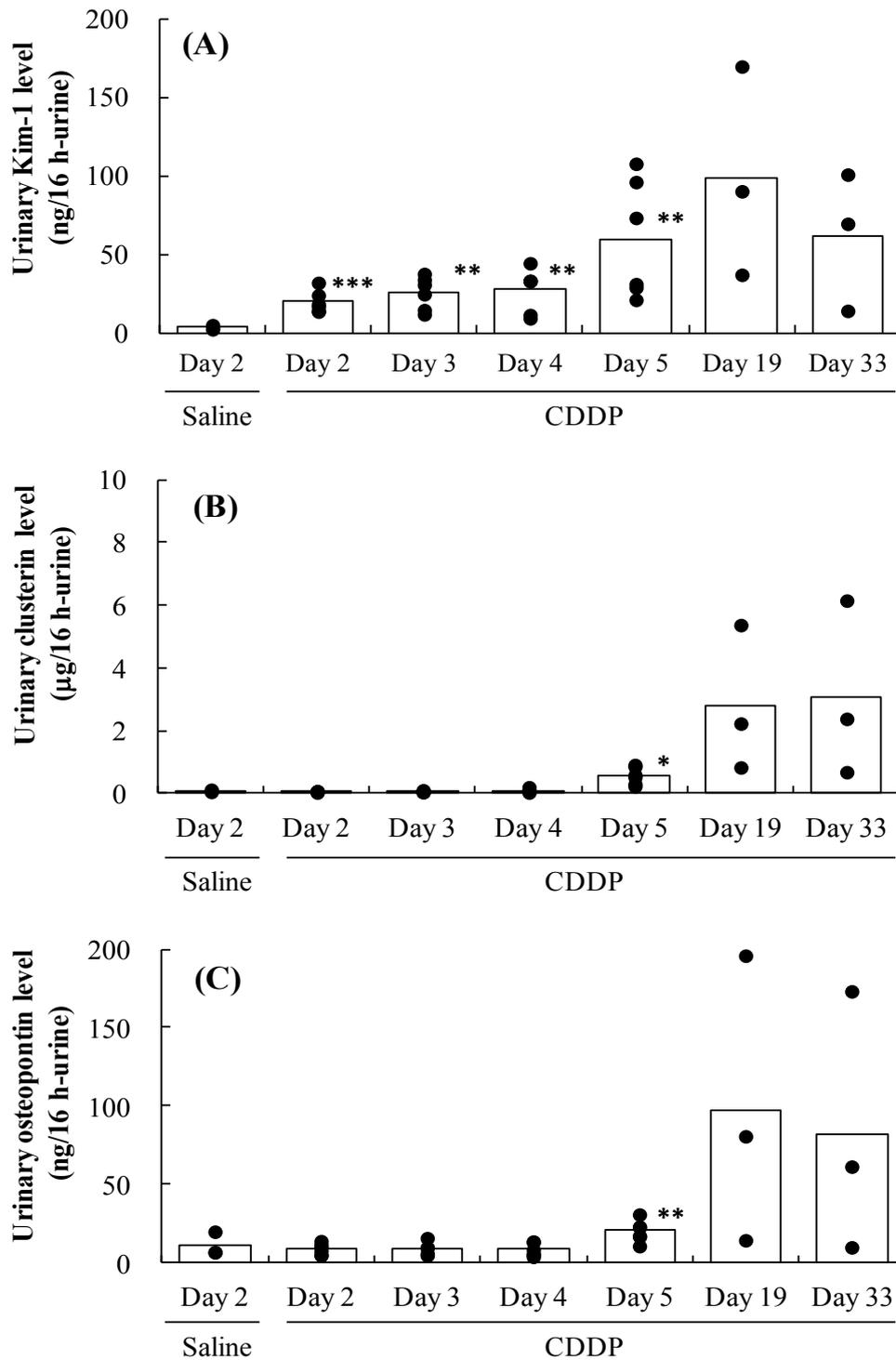


Fig. 3. The CDDP-induced changes in the levels of urinary Kim-1 (A), clusterin (B) and osteopontin (C) in the rats examined in “Experimental model 1 “.
 The 16 h-urine was collected from each rat at the indicated schedule (Fig. 2) and used for the assays of the indicated biomarkers. Closed circles represent the individual rats (three or six rats at each time point examined). The open bar represents the mean value of each experimental group.
 *****Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups:
 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

病理組織学的検査の結果を Fig. 4 及び Table 8 に示した。Day 5 の腎臓において、近位尿細管上皮細胞の変性（空胞化、壊死、脱落）、尿円柱形成、間質への炎症細胞浸潤が認められた。Day 19 及び 33 に尿中 Kim-1、クラステリン及びオステオポンチン排泄量が増加した 2 例のラットでは、Day 33 の腎臓の病変は進展し、近位尿細管上皮細胞の再生、尿細管の嚢胞状拡張、間質の線維化も認められた。

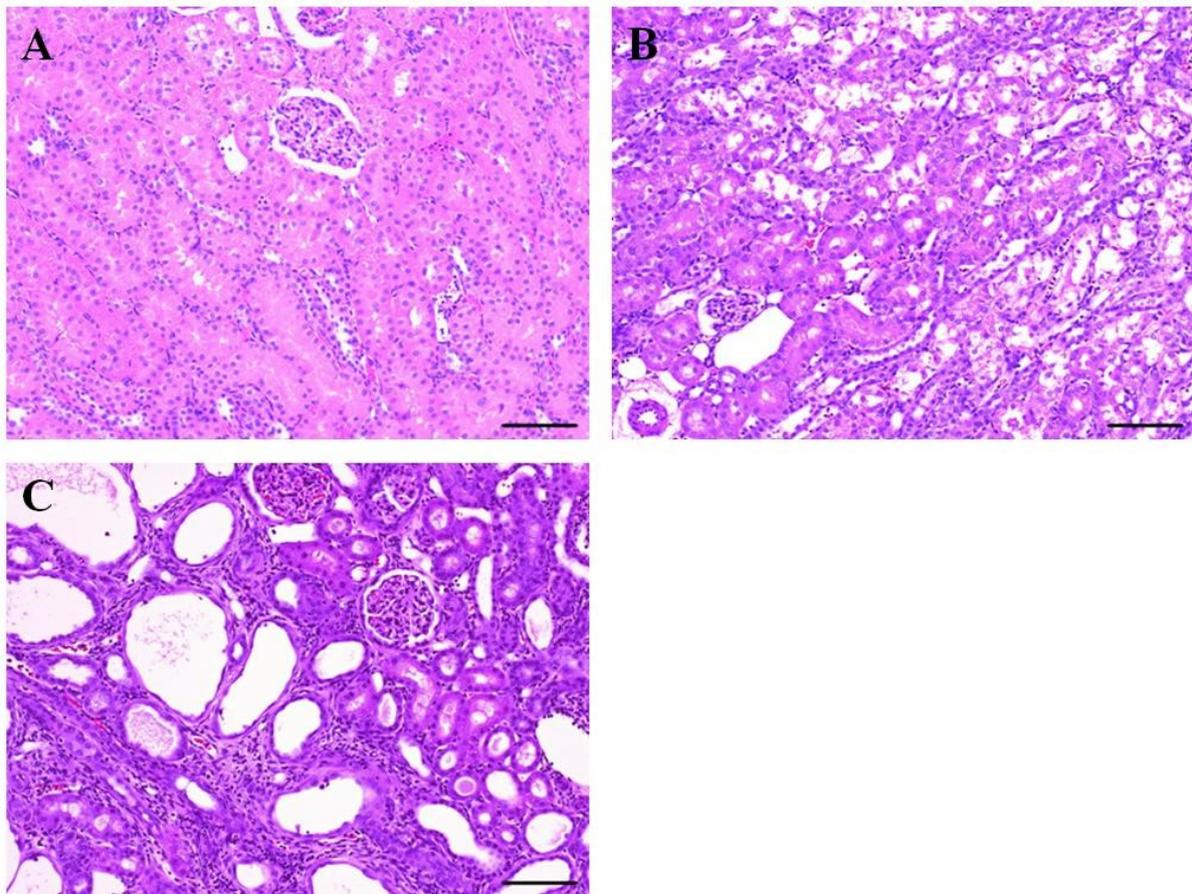


Fig. 4. Representative photomicrographs of renal tissues from the rats treated with saline (A) or CDDP at a dose of 1.5 mg/kg/day (B and C) for four days at 24 h-intervals. The analyses were performed using the rats in “Experimental model 1”. The tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. No clear changes are observed in the saline-treated rats on Day 5 (A). In the CDDP-treated rats, degeneration (vacuolization, necrosis, and desquamation) of the proximal tubular epithelial cells, urinary cast formation and interstitial inflammatory cell infiltration are observed on Day 5 (B). On the Day 33 (C), further progression of the lesions, including regeneration of proximal tubular epithelial cells, cystic dilation of the renal tubules, pronounced interstitial mononuclear cell infiltration and fibrosis of the interstitial tissues, is observed. Scale bar: 100 μ m.

Table 8. The CDDP-induced histopathological changes of renal tissues in the rats examined in “Experimental model 1”

Findings	Saline		CDDP	
	Day 5	Day 33	Day 5	Day 33
Degeneration (vacuolization, necrosis, desquamation) of proximal tubular epithelium	—	—	2+ (3/3) ^a	± (1/3) 2+ (1/3) 3+ (1/3)
Regeneration of proximal tubular epithelium	—	—	—	± (1/3) 2+ (1/3) 3+ (1/3)
Urinary cast formation	—	—	± (2/3) + (1/3)	+ (1/3) 2+ (1/3)
Cystic tubular dilatation	—	—	—	2+ (1/3) 3+ (1/3)
Interstitial inflammatory cell infiltration	—	—	± (1/3) 2+ (1/3) 3+ (1/3)	+ (1/3) 2+ (1/3) 3+ (1/3)

Histopathological grade: -, no change; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe

The “Days 5 and 33” are the necropsy days shown in Fig. 2.

^a The numbers shown in parentheses represent the number of animals with findings/number of animals examined.

実験モデル 2

試験期間中、シスプラチンを投与したラットにおいて一般状態（外観、姿勢及び行動）の異常は認められなかった。また、対照群とシスプラチン投与群において体重推移に明らかな差は認められなかった。

血中バイオマーカーの測定結果を Table 9 に示した。

シスプラチン 1.5 mg/kg を週 1 回 2、4 及び 6 週間投与後 7 日目においては、BUN、SCr 及び血清シスタチン C 値の明らかな変動は認められなかった。シスプラチン週 1 回 10 週間投与後 7 日目において、対照群と比較して BUN 及び SCr の有意な増加が認められた（対照群比：3.6 及び 2.7 倍）。

Table 9. The CDDP-induced changes in the levels of serum biomarkers in the rats examined in “Experimental model 2”

Treatment	Week of blood collection	Number of dosing	BUN (mg/dL)	SCr (mg/dL)	Cystatin C (mg/L)
Saline	11	10	13.4 ± 0.8 (3) ^a	0.29 ± 0.05 (3)	0.12 ± 0.01 (3)
	3	2	14.4 ± 1.9 (3)	0.26 ± 0.05 (3)	0.15 ± 0.03 (3)
	5	4	10.7 ± 0.9 (3)	0.27 ± 0.04 (3)	0.13 ± 0.02 (3)
	7	6	16.5 ± 2.1 (3)	0.32 ± 0.08 (3)	0.14 ± 0.03 (3)
	11	10	48.4 ± 12.8* (3)	0.79 ± 0.14** (3)	0.20 ± 0.03 (3)

Blood collections were performed at the indicated schedule shown in Fig. 2.

^a The numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined. The value of each biomarker presents the mean ± SD.

*** Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

シスプラチン投与後 6 日から 7 日に採取した尿を用いて各種尿中バイオマーカーを測定した結果を Fig. 5 及び Table 10 に示した。

Kim-1 排泄量はシスプラチン週 1 回 4 週間投与後の 7 日目 (Week 5) から既に有意に増加し、その後、投与回数の増加に伴った排泄量の増加傾向が確認された。Week 5、7、9 及び 11 の Kim-1 排泄量は、対応する対照群と比較すると 2.8、3.5、9.7 及び 15.2 倍であった。オステオポンチン排泄量は Week 9 に有意に増加し、Week 11 ではさらに増加した。また、Week 7 及び 9 においてクラステリン排泄量、Week 9 において NGAL 排泄量が有意に増加した。一方、試験期間を通じてアルブミン及びグルコース排泄量の明らかな変動は認められなかった。実験モデル 1 と同様、対照群及びシスプラチン投与群共に、尿中クレアチニン排泄量の経時的な増加が認められた。

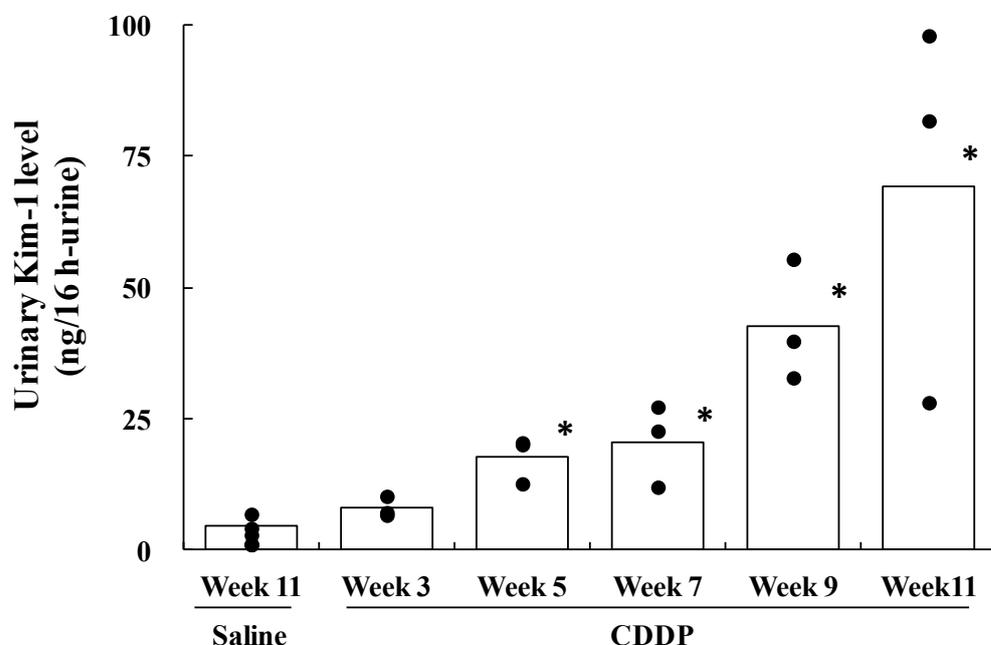


Fig. 5. The CDDP-induced changes in the levels of urinary Kim-1 in the rats examined in “Experimental model 2”. The 16 h-urine was collected from each rat at the indicated schedule (Fig. 2) and used for the assays of the Kim-1. Closed circles represent the individual rats (three rats at each time point examined). The open bar represents the mean value of each experimental group.

*Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups:

* $P < 0.05$.

Table 10. The CDDP-induced changes in the levels of urinary biomarkers in the rats examined in “Experimental model 2”

Biomarkers (Amount/16 h-urine)	Treatment	Week 3	Week 5	Week 7	Week 9	Week 11
Albumin (mg)	Saline	1.13 ± 0.35 (3) ^a	1.40 ± 0.15 (3)	1.14 ± 0.44 (3)	0.91 ± 0.23 (3)	1.24 ± 0.14 (3)
	CDDP	1.15 ± 0.68 (3)	0.96 ± 0.52 (3)	0.99 ± 0.44 (3)	1.45 ± 0.71 (3)	2.94 ± 2.16 (3)
Clusterin (µg)	Saline	0.10 ± 0.03 (3)	0.18 ± 0.03 (3)	0.11 ± 0.02 (3)	0.17 ± 0.06 (3)	0.13 ± 0.03 (3)
	CDDP	0.12 ± 0.04 (3)	0.18 ± 0.05 (3)	0.27 ± 0.06* (3)	0.25 ± 0.09 (3)	0.32 ± 0.10* (3)
Creatinine (mg)	Saline	3.72 ± 0.93 (3)	5.59 ± 0.69 (3)	6.30 ± 0.77 (3)	6.74 ± 1.82 (3)	7.67 ± 0.89 (3)
	CDDP	3.52 ± 0.66 (3)	4.46 ± 0.57* (3)	5.55 ± 1.12 (3)	6.55 ± 0.79 (3)	6.78 ± 0.64 (3)
Glucose (g)	Saline	0.61 ± 0.34 (3)	0.56 ± 0.43 (3)	0.69 ± 0.06 (3)	0.98 ± 0.11 (3)	2.47 ± 1.75 (3)
	CDDP	0.68 ± 0.32 (3)	0.41 ± 0.39 (3)	1.06 ± 0.29 (3)	1.05 ± 0.21 (3)	1.34 ± 0.70 (3)
Kim-1 (ng)	Saline	5.87 ± 0.81 (3)	6.39 ± 0.81 (3)	5.83 ± 2.08 (3)	4.38 ± 0.65 (3)	4.55 ± 2.02 (3)
	CDDP	7.96 ± 1.95 (3)	17.66 ± 4.41* (3)	20.58 ± 7.84* (3)	42.63 ± 11.57* (3)	69.25 ± 36.60* (3)
NGAL (µg)	Saline	0.66 ± 0.22 (3)	0.47 ± 0.06 (3)	0.47 ± 0.21 (3)	0.54 ± 0.08 (3)	0.50 ± 0.11 (3)
	CDDP	0.99 ± 0.24 (3)	1.10 ± 0.37 (3)	1.01 ± 0.25 (3)	1.81 ± 0.23* (3)	3.11 ± 2.24 (3)
Osteopontin (ng)	Saline	10.41 ± 4.51 (3)	8.26 ± 2.75 (3)	9.03 ± 3.30 (3)	10.74 ± 3.21 (3)	9.30 ± 1.91 (3)
	CDDP	10.34 ± 1.04 (3)	9.06 ± 4.11 (3)	10.74 ± 3.24 (3)	20.43 ± 4.42* (3)	61.19 ± 31.26* (3)

The 16 h-urine was collected from each rat at the indicated schedule (Fig. 2) and used for the assays of the indicated biomarkers. The “Days” described are identified with those in “Experimental model 2” (Fig. 2).

^aThe numbers shown in parentheses represent the number of the animals examined. The data of each biomarker examined present the mean ± SD.

*Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups: **P* < 0.05.

腎臓の病理組織学的検査の結果を Fig. 6 及び Table 11 に示した。シスプラチン週 1 回 2 及び 4 週間投与後 7 日目の腎臓では病変は認められなかった。シスプラチン週 1 回 6 週間投与後 7 日目の腎臓において、ごく軽度から軽度の近位尿細管上皮細胞の変性（空胞化、壊死、脱落、再生）、ごく軽度の尿円柱形成、ごく軽度から軽度の間質への炎症細胞浸潤が認められた。週 1 回 10 週間投与後では病変は進展し、6 週間投与により認められた病変に加えて、尿細管の嚢胞状拡張も認められた。

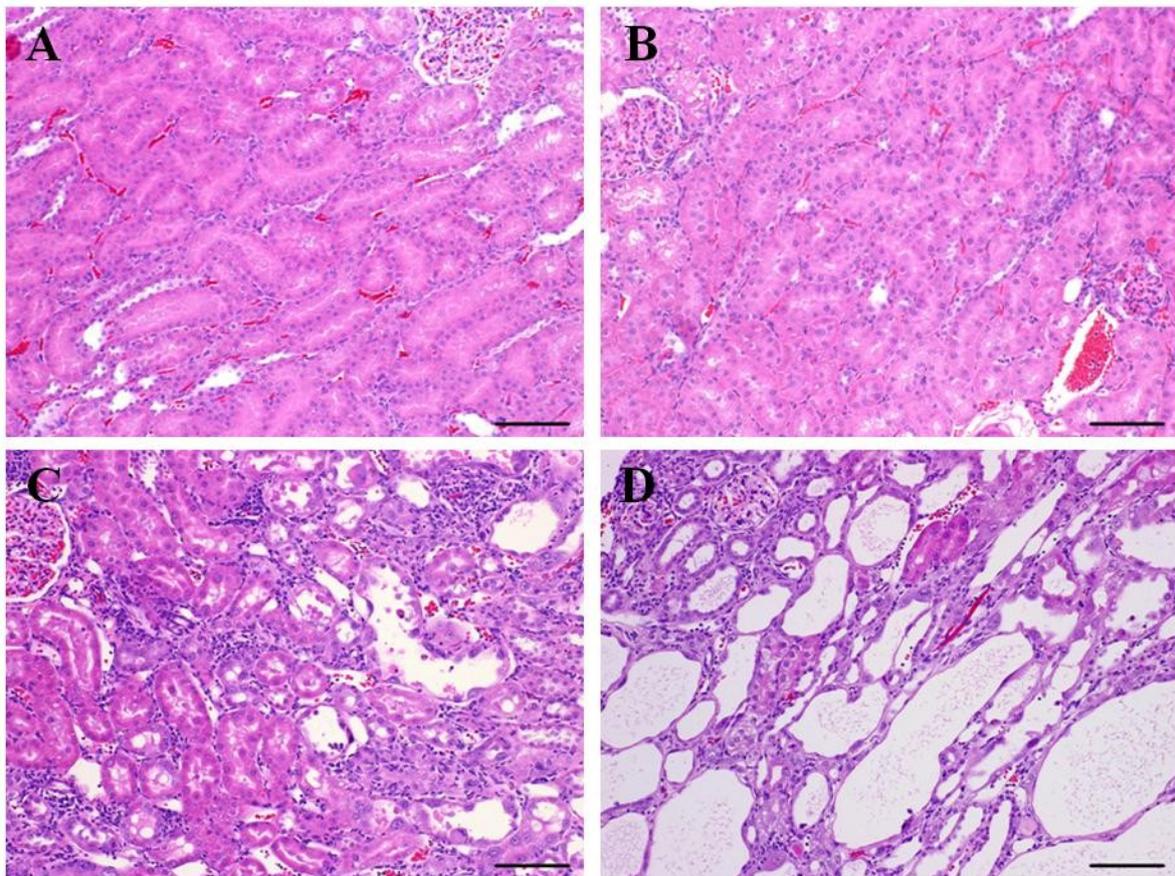


Fig. 6. Representative photomicrographs of renal tissues from rats treated with saline (A) or CDDP at a dose of 1.5 mg/kg/week (B-D) for four, six, and 10 weeks at weekly intervals. The analyses were performed using the rats in “Experimental model 2”. The tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. One week after the four-week treatment with CDDP (B), no clear changes are observed in the rat renal tissues. In the renal tissues one week after the six-week treatment with CDDP (C), mild degeneration (vacuolization, necrosis and desquamation) of the proximal tubular epithelial cells and interstitial inflammatory cell infiltration are observed. Further progression of the lesions is observed in the rats one week after the 10-week treatment with CDDP (D). Scale bar: 100 μ m.

Table 11. The CDDP-induced histopathological changes of renal tissues from the rats examined in “Experimental model 2”

Findings	Saline	CDDP			
	Week 11	Week 3	Week 5	Week 7	Week 11
Degeneration (vacuolization, necrosis, desquamation) of proximal tubular epithelium	—	—	—	± (2/3) ^a + (1/3)	+ (3/3)
Regeneration of proximal tubular epithelium	—	—	—	± (2/3) + (1/3)	2+ (3/3)
Urinary cast formation	—	—	—	± (1/3)	+ (1/3) 2+ (2/3)
Cystic tubular dilatation	—	—	—	—	+ (1/3) 2+ (2/3)
Interstitial inflammatory cell infiltration	—	—	—	± (2/3) + (1/3)	2+ (3/3)

Histopathological grade: -, no change; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe

The “Weeks 3, 5, 7 and 11” are the necropsy weeks shown in Fig. 2.

^a The numbers shown in parentheses represent the number of animals with findings/number of animals examined.

実験モデル 3

試験期間中、シスプラチンを投与したラットにおいて一般状態（外観、姿勢及び行動）の異常は認められなかった。また、対照群とシスプラチン投与群において体重推移に明らかな差は認められなかった。

腎臓に病理組織学的変化が認められないと考えられるシスプラチン 1.5 mg/kg の週 1 回 4 週間投与後の 7 日目において、尿中 Kim-1 排泄量は有意に増加し、実験モデル 2 の結果の再現性が確認された。その後、シスプラチンの休薬により Kim-1 排泄量は経時的に減少した（Fig. 7）。シスプラチン休薬 7 週間後の腎臓においては、明らかな病理組織学的変化は認められなかった（データ示さず）。なお、試験期間を通じて、他の尿中バイオマーカー（アルブミン、クラステリン、グルコース、NGAL 及びオステオポンチン）の明らかな変動は認められなかった（データ示さず）。

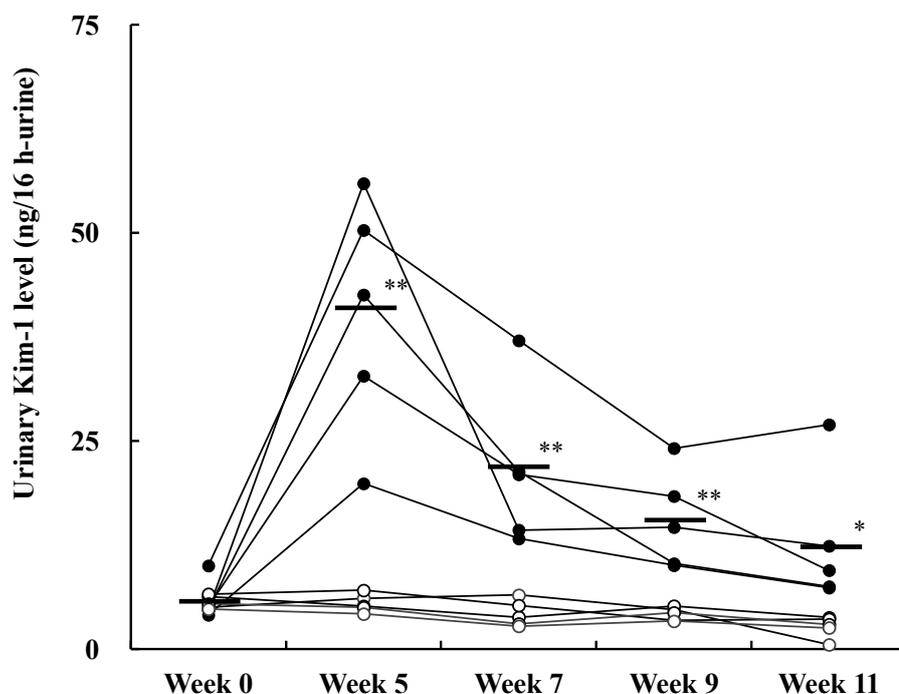


Fig. 7. The changes in the levels of urinary Kim-1 after CDDP cessation.

The analyses were performed using the rats in “Experimental model 3”.

The 16 h-urine was collected from each rat and used for determining amounts of Kim-1. Closed circles represent the individual rats treated with CDDP (five rats at each time point examined). The bar represents the mean value of each experimental group. Open circles represented the individual rats treated with saline. “Week 0” means just one week before the first administration (Fig. 2).

***Statistically significant differences from the corresponding saline-treated groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

第四節 考察

低用量のシスプラチンの反復投与により慢性的な腎障害が惹起されることが報告されている。^{24, 25)} そこで、本章では単回投与では腎障害が認められない用量（1.5 mg/kg）のシスプラチンを異なる 2 通りの投与スケジュールでラットに反復静脈内投与して亜急性から慢性腎障害を惹起した。各種尿中バイオマーカーを経時的に測定し、腎臓の病理組織学的変化との関連性を追究すると共に、従来の中バイオマーカー変動との関連性を調べた。

まずは、病変の進展をモニター可能なバイオマーカーを探索するために、シスプラチンを 1 日 1 回 4 日間反復静脈内投与して腎障害を惹起した（実験モデル 1）。最終投与翌日（Day 5）の腎臓において近位尿細管の障害や間質への炎症細胞浸潤が認められた。その後シスプラチンの投与を中止しても病変は進展し、Day 33 では間質への著明な単核細胞浸潤や間質の線維化病変といった慢性腎障害様の病変を呈した。血中バイオマーカーの BUN や SCr は Day 5 に増加したが、それらの増加は病変の進展とは関連せず、Day 33 の値は Day 5 と同程度であった。それに対し、尿中 Kim-1 排泄量は、Day 2（シスプラチン 1 回投与）から有意に増加し、投与回数の増加に伴って増加した。さらに病変の進展が認められた 2/3 例のラットでは、Day 19 及び Day 33 の Kim-1 排泄量は Day 5 よりも明らかに高値を示した。Kim-1 以外のバイオマーカーでは、Day 5 において尿中クラステリン及びオステオポンチン排泄量の増加が認められ、Kim-1 と同様、病変が進展した 2 例のラットでは Day 19 及び 33 にさらに排泄量が増加した。このように尿中 Kim-1、クラステリン及びオステオポンチンは、シスプラチン反復投与による腎障害の進展を反映するバイオマーカーになると考えられた。なお、シスプラチン誘発ラット AKI（第一章）で変動が認められた尿中アルブミン及びグルコース排泄量は、実験モデル 1 においても Day 4 や 5 に増加が認められたが、変化は一過性であることからシスプラチンの反復投与により惹起されるラット腎障害の進展のモニターには不相当と判断した。

次に、シスプラチン反復投与による腎障害を早期に検出できるバイオマーカーを探索するために、シスプラチンをラットに週 1 回最長 10 週間反復投与して腎障害を惹起した（実験モデル 2）。病理組織学的検査の結果、4 週投与まで腎病変は認められなかった。6 週投与後に軽度の腎病変が確認され、10 週投与後には病変は進展し、尿細管の嚢胞状拡張や間質への単核細胞浸潤も認められた。BUN、SCr 及び血清シスタチン C は 10 週投与後に初めて増加したのに対し、尿中 Kim-1 排泄量は 4 週投与後から増加し、その量はシスプラチンの投与回数の増加に伴ってさらに増加した。尿中 Kim-1 はシスプラチンの反復投与による腎障害を従来の中バイオマーカーよりも早期に検出可能であり、実験モデル 1 での検討と同様に、尿中 Kim-1 は病変の進展と共に増加することを明らかにした。

Kim-1 は、主に近位尿細管 S3 セグメントでの増殖・脱分化した上皮細胞やビメンチン陽性の上皮細胞に発現することが知られている。²⁸⁾ また、Kim-1 及び α -SMA

は尿細管や間質の障害部位に共局在化することが知られている。^{33, 34)} 加えて、臨床においては、Kim-1 は線維化が認められる領域での拡張した尿細管上皮細胞の管腔側に発現誘導されるという報告もある。^{35, 36)} こうしたことから近位尿細管上皮細胞における Kim-1 の発現誘導は尿細管再生や間質の線維化形成に深く関与していると考えられる。

ラット、イヌ及び霊長類の AKI において尿中クラスτεリン排泄量が増加することが多く報告されており、AKI に対するバイオマーカーとしての尿中クラスτεリンが期待されている。^{8, 17)} 加えてクラスτεリンは障害後の脱分化した尿細管上皮細胞に発現するという報告も存在し³⁷⁾、尿細管の再生にも関与していることが考えられる。オステオポンチンは腎臓では単球やマクロファージの集簇に深く関与し、様々なラットの腎疾患において高発現することが確認されている。³⁸⁻⁴⁰⁾

以上の知見から、実験モデル 1 で認められた病変の進展に伴った尿中 Kim-1、クラスτεリン及びオステオポンチン排泄量の増加は、シスプラチンの投与により障害された尿細管の再生、間質への単核球浸潤や線維化病変を反映した変化であると考えられ、これらの 3 つの尿中バイオマーカーは、シスプラチンの反復投与による腎障害の進展のモニターに有用なバイオマーカーになる可能性が示された。中でも尿中 Kim-1 排泄量は、実験モデル 1 及び 2 において腎臓の病理組織学的変化に先立って増加することが確認されており、腎障害を早期に検出できるという点からもバイオマーカーとしての有用性は非常に高いと考えられた。

Kim-1 は構造や機能面での種相同性が高く、動物からヒトへのトランスレーションが比較的容易にできることも利点として挙げられる。²⁸⁾ 実際、尿中 Kim-1 は臨床での AKI の診断マーカーとしての有用性が確認されている。^{41, 42)} こうしたことから、尿中 Kim-1 はヒトでの薬剤誘発腎障害の早期診断や病変のモニターに価値のあるバイオマーカーとなる可能性が期待できる。

Kim-1 の有用性をさらに検証するため、実験モデル 2 において尿中 Kim-1 排泄量が増加した週 1 回 4 週間投与時点でシスプラチンの投与を中止し、その後の尿中 Kim-1 排泄量の変動や腎臓の病変を確認した (実験モデル 3)。結果、シスプラチンの 4 週間投与によって著明に増加した尿中 Kim-1 排泄量は、シスプラチンの休薬により経時的に減少した。また、7 週間休薬後の腎臓においては明らかな病理組織学的変化は確認されなかった。このことは尿中 Kim-1 量をモニターして、尿中 Kim-1 が増加した時点でシスプラチンの投与を中止することによって、シスプラチンによる重篤な副作用を回避できる可能性を示し、臨床でのシスプラチンの適切な治療にもつながることが期待できる。

本章では腎障害惹起物質として近位尿細管障害を引き起こすシスプラチンを用いて尿中バイオマーカーの有用性を明らかにした。しかし、薬剤誘発性腎障害には様々なタイプが存在するため、単一のバイオマーカーで網羅的に様々な腎障害を予測することは困難と思われる。今後は障害のタイプの異なる腎障害物質を用いて、どのバイオマーカーがどのタイプの腎障害に利用できるのかを検討する必要がある。複数のバイ

バイオマーカーを組み合わせることで同時に測定するパネル化により、腎障害の予測性や診断精度の向上も期待できる。

現状、非臨床試験における尿中腎障害バイオマーカーは、腎毒性が懸念された場合の付加的データや化合物選択ツールとしての使用が主であり、十分に活用されていない。⁴³⁾ その理由としてはバイオマーカーの特徴や腎障害の判定基準が明確になっていないことが挙げられる。高感度のバイオマーカーは変化が生じやすいため、軽度の変化をどのように判定するかについての検討が不十分である。今後は非臨床試験で見出されたバイオマーカー変動と病理組織学的検査との関連性を徹底的に精査し、特徴を明らかにする必要がある。また、臨床でもバイオマーカー研究は盛んに行われており、尿中バイオマーカー候補として、前述した Kim-1 以外にも NGAL、IL-18、L-FABP 等が報告されている。^{41, 42, 44)} 特に L-FABP は慢性腎臓病の早期診断、病変のモニタリングや予後予測にも有用であることが示されている。⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 臨床からフィードバックされたバイオマーカーを病理組織学的検査が可能な動物を用いて精査することも有用な手段である。

以上、本章では、尿中 Kim-1、クラスペリン及びオステオポンチン排泄量はシスプラチンの反復投与により誘発されるラット腎障害の病変をモニターできることを明らかにした。中でも尿中 Kim-1 は、従来の血中バイオマーカーよりも腎障害を早期に検出できること、尿中 Kim-1 排泄量のモニタリングにより障害の進展や重症化を予測できることが見出されたことから、今回測定したバイオマーカーの中では、シスプラチンの反復投与によるラット腎障害の検出に対して最も優れたバイオマーカーになることを明らかにした。

総括

理想の腎障害バイオマーカーの条件として、腎障害の早期に鋭敏に変動すること、特異性があること、病変の程度を反映していることなどが挙げられる。検出感度や特異性の優れたバイオマーカーの存在は、より早い段階での薬剤用量の調整や投薬中止が可能となり、薬剤投与による有害事象の発生頻度の低下が期待できる。

現在、非臨床試験や臨床での腎障害の検出には BUN や SCr がバイオマーカーとして汎用されているが、どちらのバイオマーカーも検出感度が低く、特異性も十分とはいえない。こうしたことから腎障害を早期かつ特異的に検出可能な新規バイオマーカーの探索が精力的に行われており、ラットの AKI に対する有用な尿中バイオマーカーが多く報告されている。しかしながら、腎障害物質の反復投与により惹起される亜急性から慢性腎障害の発症や病変進展過程において、腎臓の病理組織学的変化と尿中バイオマーカー変動との関連性を詳細に解析した報告は存在しない。

そこで、本研究では、シスプラチンをラットに反復投与して惹起される亜急性から慢性腎障害の早期検出や病変の進展のモニターが可能なバイオマーカーを検索した。

第一章では、ラットにシスプラチンを単回静脈内投与することにより AKI を惹起し、代表的な AKI に対する尿中バイオマーカーの有用性を確認した。その結果、既存の報告と同様、尿中アルブミン及び Kim-1 は従来の血中バイオマーカーよりも早期に腎障害を検出できることを確認した。特に、尿中 Kim-1 は、腎臓の病理組織学的変化が認められないシスプラチンの用量から排泄量が増加することから、シスプラチン誘発ラット AKI に対して優れたバイオマーカーになることを示した。

第二章では、単回投与では腎障害が認められない用量のシスプラチンを異なる 2 通りの投与スケジュールでラットに反復静脈内投与して亜急性から慢性腎障害を惹起した。そして、代表的な AKI に対する尿中バイオマーカーを経時的に測定し、腎臓の病理組織学的変化や従来の血中バイオマーカー変動との関連性を調べた。その結果、尿中 Kim-1 は、従来の血中バイオマーカーよりも早期に腎障害を検出できること、腎障害の病変の進展をモニターできること、尿中 Kim-1 排泄量のモニタリングにより病変の進展や重症化を予測できることを明らかにした。

以上、本研究により、ラットの AKI の検出に有用性が報告されている尿中 Kim-1 は、シスプラチンの反復投与により惹起されるラットの亜急性から慢性腎障害を検出するバイオマーカーとして極めて有用性が高いことを明らかにした。加えて、尿中 Kim-1 は腎臓の病理組織学的変化が観察される以前に増加が認められることや腎障害の程度を反映して増加することから、シスプラチン誘発腎障害の早期診断やシスプラチンの適切な使用に向けて有用なバイオマーカーになることを示した。これらの研究成果は、医薬品開発時における腎毒性評価の向上・発展、また、臨床現場での重篤な副作用の回避や適切な薬剤治療にもつながるものと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました本学大学院薬学研究科 衛生分子毒性学講座教授 出川雅邦先生に謹んで感謝申し上げます。

本論文を査読していただきました本学大学院薬学研究科 免疫微生物学講座教授 今井康之先生、本学大学院薬学研究科 臨床薬剤学講座教授 賀川義之先生、本学大学院薬学研究科 分子病態学講座教授 森本達也先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益なご助言を賜りました協和発酵キリン株式会社研究本部マネジャー 日下英昭博士、同研究本部創薬基盤研究所主任研究員 小島夏樹博士ならびに同研究本部探索研究所主任研究員 高場克己博士に深く感謝いたします。

本研究に際し、実験を共にしていただき、多大なるご協力を賜りました協和発酵キリン株式会社研究本部開発研究所 梶原政朝氏に心より感謝申し上げます。

本研究の多大なる支援と発表の機会を与えていただきました協和発酵キリン株式会社社長 花井陳雄博士、同研究本部長 岡崎寛博士ならびに同研究本部探索研究所所長 大上欽也博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Pfaller W, Gstraunthaler G. 1998. Nephrotoxicity testing in vitro-what we know and what we need to know. *Environ. Health Perspect.* **106**: 559-569.
2. Hart SGE. 2005. Assessment of renal injury in vivo. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **52**: 30-45.
3. Marrer E, Dieterle F. 2010. Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **243**: 167-179.
4. Proulx NL, Akbari A, Garg AX, Rostom A, Jaffey J, Clark HD. 2005. Measured creatinine clearance from timed urine collections substantially overestimates glomerular filtration rate in patients with liver cirrhosis: a systematic review and individual patient meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**: 1617-1622.
5. Bonventre JV, Vaidya VS, Schmodder R, Feig P, Dieterle F. 2010. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol.* **28**: 436-440.
6. Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. 2011. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers* **16**: S22-S30.
7. Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, Papaluca M, Ozer JS, Webb CP, Baer W, Senagore A, Schipper MJ, Vonderscher J, Sultana S, Gerhold DL, Phillips JA, Maurer G, Carl K, Laurie D, Harpur E, Sonee M, Ennulat D, Holder D, Andrews-Cleavenger D, Gu Y, Thompson KL, Goering PL, Vidal J, Abadie E, Maciulaitis R, Jacobson-Kram D, Defelice AF, Hausner EA, Blank M, Thompson A, Harlow P, Throckmorton D, Xiao S, Xu N, Taylor W, Vamvakas S, Flamion B, Lima BS, Kasper P, Pasanen M, Prasad K, Troth S, Bounous D, Robinson-Gravatt D, Betton G, Davis MA, Akunda J, McDuffie JE, Suter L, Obert L, Guffroy M, Pinches M, Jayadev S, Blomme EA, Beushausen SA, Barlow VG, Collins N, Waring J, Honor D, Snook S, Lee J, Rossi P, Walker E, Mattes W. 2010. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat. Biotechnol.* **28**: 455-462.
8. Dieterle F, Perentes E, Cordier A, Roth DR, Verdes P, Grenet O, Pantano S, Moulin P, Wahl D, Mahl A, End P, Staedtler F, Legay F, Carl K, Laurie D, Chibout S, Vonderscher J, Maurer G. 2010. Urinary clusterin, cystatin C, β 2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat. Biotechnol.* **28**: 463-469.

9. Yu Y, Jin H, Holder D, Ozer JS, Villarreal S, Shughrue P, Shi S, Figueroa DJ, Clouse H, Su M, Muniappa N, Troth SP, Bailey W, Seng J, Aslamkhan AG, Thudium D, Sistare FD, Gerhold DL. 2010. Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat. Biotechnol.* **28**: 470-477.
10. Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S, Muniappa N, Thudium D, Gerhold D, Holder DJ, Bobadilla NA, Marrer E, Perentes E, Cordier A, Vonderscher J, Maurer G, Goering PL, Sistare FD, Bonventre JV, 2010. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat. Biotechnol.* **28**: 478-485.
11. Gautier J, Riefke B, Walter J, Kurth P, Mylecraine L, Guilpin V, Barlow N, Gury T, Hoffman D, Ennulat D, Schuster K, Harpur E, Pettit S. 2010. Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with cisplatin. *Toxicol. Pathol.* **38**: 943-956.
12. Harpur E, Ennulat D, Hoffman D, Betton G, Gautier J, Riefke B, Bounous D, Schuster K, Beushausen S, Guffroy M, Shaw M, Lock E, Pettit S. 2011. Biological qualification of biomarkers of chemical-induced renal toxicity in two strains of male rat. *Toxicol. Sci.* **122**: 235-252.
13. Hoffmann D, Adler M, Vaidya VS, Rached E, Mulrane L, Gallagher WM, Callanan JJ, Gautier JC, Matheis K, Staedtler F, Dieterle F, Brandenburg A, Sposny A, Hewitt P, Ellinger-Ziegelbauer H, Bonventre JV, Dekant W, Mally A. 2010. Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. *Toxicol. Sci.* **116**: 8-22.
14. Tonomura Y, Tsuchiya N, Torii M, Uehara T. 2010. Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats. *Toxicology* **273**: 53-59.
15. Sasaki D, Yamada A, Umeno H, Kurihara H, Nakatsuji S, Fujihira S, Tsubota K, Ono M, Moriguchi A, Watanabe K, Seki J. 2011. Comparison of the course of biomarker changes and kidney injury in a rat model of drug-induced acute kidney injury. *Biomarkers* **16**: 553-566.
16. Hosohata K, Ando H, Fujimura A. 2012. Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**: 656-662.
17. Vinken P, Starckx S, Barale-Thomas E, Looszova A, Sonee M, Goeminne N, Versmissen L, Buyens K, Lampo A. 2012. Tissue Kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Toxicol. Pathol.* **40**: 1049-1062.

18. Hoffmann D, Fuchs TC, Henzler T, Matheis KA, Herget T, Dekant W, Hewitt P, Mally A. 2010. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology* **277**: 49-58.
19. Rouse RL, Zhang J, Stewart SR, Rosenzweig BA, Espandiari P, Sadrieh NK. 2011. Comparative profile of commercially available urinary biomarkers in preclinical drug-induced kidney injury and recovery in rats. *Kidney Int.* **79**: 1186-1197.
20. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構、ファーマコゲノミクス・バイオマーカー相談に関する記録、平成 22 年 5 月 31 日
21. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. 1997. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**: 2478-2480.
22. Arany I, Safirstein RL. 2003. Cisplatin Nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* **23**: 460-464.
23. Pinches M, Betts C, Bickerton S, Burdett L, Thomas H, Derbyshire N, Jones HB, Moores M. 2012. Evaluation of novel renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences. *Toxicol. Pathol.* **40**: 522-533.
24. Fenoglio C, Boncompagni E, Chiavarina B, Cafaggi S, Cilli M, Viale M. 2005. Morphological and histochemical evidence of the protective effect of procainamide hydrochloride on tissue damage induced by repeated administration of low doses of cisplatin. *Anticancer Res.* **25**: 4123-4128.
25. González R, Romay C, Borrego A, Hernández F, Merino N, Zamora Z, Rojas E. 2005. Lipid peroxides and antioxidant enzymes in cisplatin-induced chronic nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm.* **3**: 139-143.
26. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. 2008. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**: 463-493.
27. Ichimura T, Asseldonk EJP, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. 2008. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **118**: 1657-1668.
28. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M. 1998. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* **273**: 4135-4142.

29. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. 2006. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: F517-F529.
30. Prozialeck WC, Vaidya VS, Liu J, Waalkes MP, Edwards JR, Lamar PC, Bernard AM, Dumont X, Bonventre JV. 2007. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int.* **72**: 985-993.
31. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP, Zhang J, Rosenzweig BA, Thompson KL, Miller TJ, Bonventre JV, Goering PL. 2008. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol. Sci.* **101**: 159-170.
32. Swain A, Turton J, Scudamore C, Maguire D, Pereira I, Freitas S, Smyth R, Munday M, Stamp C, Gandhi M, Sondh S, Ashall H, Francis I, Woodfine J, Bowles J, York M. 2011. Nephrotoxicity of hexachloro-1:3-butadiene in the male Hanover Wistar rat; correlation of minimal histopathological changes with biomarkers of renal injury. *J. Appl. Toxicol.* **32**: 417-428.
33. Kuehn EW, Park KM, Somlo S, Bonventre JV. 2002. Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**: F1326-F1336.
34. Kramer AB, van Timmeren MM, Schuurs TA, Vaidya VS, Bonventre JV, van Goor H, Navis G. 2009. Reduction of proteinuria in adriamycin-induced nephropathy is associated with reduction of renal kidney injury molecule (Kim-1) over time. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**: F1136-F1145.
35. van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, Bakker SJL, van Goor H, Stegeman CA. 2007. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J. Pathol.* **212**: 209-217.
36. Huo W, Zhang K, Nie Z, Li Q, Jin F. 2010. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant. Rev.* **24**: 143-146.
37. Correa-Rotter R, Ibarra-Rubio ME, Schwochau G, Cruz C, Silkensen JR, Pedraza-Chaverri J, Chmielewski D, Rosenberg ME. 1998. Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 33-37.

38. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. 2001. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int.* **60**: 1645-1657.
39. Fuchs TC, Hewitt P. 2011. Preclinical perspective of urinary biomarkers for the detection of nephrotoxicity: what we know and what we need to know. *Biomark. Med.* **5**: 763-779.
40. Fuchs TC, Frick K, Emde B, Czasch S, von Landenberg F, Hewitt P. 2012. Evaluation of novel acute urinary rat kidney toxicity biomarker for subacute toxicity studies in preclinical trials. *Toxicol. Pathol.* **540**: 1031-1048.
41. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. 2002. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* **62**:237-44
42. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. 2008. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int.* **73**: 1009-1016.
43. 南谷賢一郎、加藤晴香、青木淳、孫谷弘明、2012年、腎障害バイオマーカー、谷本学校－毒性質問箱第14号、P143-153
44. Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. 2011. Biological markers of acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**: 810-820.
45. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kenjiro K. 2006: Urinary fatty acid binding protein in renal disease. *Clin. Chim. Acta.* **374**: 1-7.
46. McMahon BA, Murray PT. 2010. Urinary liver fatty acid-binding protein: another novel biomarker of acute kidney injury. *Kidney Int.* **77**: 657-659.
47. Nielsen S, Sugaya T, Hovind P, Baba T, Parving H, Rossing P. 2010. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts progression to nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* **33**: 1320-1324.