

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

毒性試験 (エンニアチン B のマウス薬物動態試験)

研究分担者 渋谷 淳 (東京農工大学大学院)

研究要旨

エンニアチン (ENs) 類についての毒性情報を得る目的で、2019 年度には ENs 混合物 (B、B1、A1) の、2020 年度にはエンニアチン B (ENB) 単体の 28 日間反復経口投与試験を実施したが、いずれも設定した用量で明らかな毒性は検出されなかった。その理由として、ENB の吸収性が低い可能性が考えられたため、本年度はマウスにおける ENB の薬物動態試験と肝臓の遺伝子発現解析を実施した。本試験では、マウスにおける高い経口バイオアベイラビリティ (85.6%) が確認された。また、肝臓の遺伝子発現解析ではシトクローム P450 をコードした遺伝子を含む、多くの代謝関連遺伝子の発現が ENB の経口投与によって増加することが明らかになった。これらの結果から、ENB がマウスの経口投与によって十分に吸収され、肝臓における代謝を受けた可能性が示唆された。以上より、ENB は経口投与により吸収されるものの、一般毒性は今回用いた用量より高い用量で出現するものと考えられた。

A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、カビ毒に汚染された食品により、急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるがんの発症などが引き起こされている。これまで厚生労働科学研究において、2001 年より様々なカビ毒について日本に流通する食品における汚染実態や毒性に関する研究を行い、カビ毒に汚染された食品の摂取の低減を目的とした施策策定の科学的根拠となるデータを取得し、食の安全性確保に貢献してきた。

エンニアチン (ENs) 類は新興カビ毒として近年関心が高まっており、欧州を中心に 2000~2013 年に 1 万試料を超える大規模な汚染実態調査が行われた。日本に流通する小麦粉を対象とした予備調査 (Food Addit Contam

Part A, 33, 1620-26, 2016) においては高濃度かつ高頻度で ENs が検出されており、毒性や小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている。

EFSA が公表した、マウスを用いた ENB の 42 日間の反復投与試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) では、公比 10 を設定し 0.18, 1.8, 18 mg/kg/日の用量で強制経口投与試験を実施し、最低毒性量、無毒性量が求められている。しかし、公比が大きかつ用量依存性の乏しいデータが多く、より正確な最低毒性量、無毒性量を求めるためにはガイドラインに沿った一般毒性試験の実施が必要であると考えられた。

2019 年度にマウスの ENs 混合物 (ENB :

ENB1 : ENA1= 4 : 4 : 1) の 28 日間反復経口投与毒性試験を、2020 年度に ENB 単体を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施したが、ENs 混合物、ENB、何れも 28 日間毒性試験では最低毒性量を求めるに至る結果は得られなかった。ENB はブローラーでの経口投与後の吸収性が低いことが文献的に示唆されており、マウス 28 日間毒性試験での明らかな毒性が検出されない理由として、マウスにおいても吸収性が低く、糞中に排泄されている可能性が考えられた。そこで本年度は、マウスにおける ENB の経口投与後の吸収性を把握することを目的に、マウスにおける ENB の薬物動態試験を実施した。また、ENs は肝臓のシトクローム P450 を介して代謝されることから、肝臓の遺伝子発現解析を実施した。

B. 研究方法

(1) 動物実験

5 週齢の雌雄マウス (ICR [CrI:CD1 (ICR)]) を日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センターより購入し、1 週間の馴化後実験に用いた。動物は空調設備の整った動物飼育室のプラスチックケージにて、12 時間の明暗サイクル、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 15\%$ の制御環境下で飼育した。飼育期間中は 1 ケージあたり 4~5 匹の動物を収容し、固形飼料 CRF-1 (γ線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社) と水道水を自由摂取させた。群構成は溶媒対照群 (5 匹)、ENB 30 mg/kg-経口投与群 (10 匹) 及び ENB 1 mg/kg-静脈内投与群 (10 匹) の 3 群構成とした (Table 1)。溶媒は、dimethyl sulfoxide の終濃度が 6% となるように、1 群では corn oil、2 群では生理食塩水に混じて調製した。6 週齢の雄性マウスに ENB を経口又は尾静脈内投与し、血中 ENB 濃度測定のために各時点において血液を採取した。また、糞中 ENB 濃度測定のために、一定期間に各群 5 匹

の糞を採材した。投与から 2 時間後には各群 5 匹を剖検に供し、肝臓 (約 30 mg/サンプル) を採材して遺伝子発現解析に用いた。肝臓サンプルは、直ちに液体窒素で凍結し、total RNA 抽出まで -80°C で保存した。解剖時及び実験終了時には当該動物を CO_2/O_2 ガスによる深麻酔下で腹大動脈から放血死させた。

一般状態の観察

馴化期間中、投与前、投与直後及び 24 時間後の間に実施した。全動物について、体外表、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た。また、投与日の 6 及び 5 日前、群分け日、投与日に体重測定を実施した。

血中エンニアチン B 濃度測定

採血は ENB 投与前及び投与から 5、30 分、2 時間後、もしくは 10 分、1、4、8、24 時間後に各群 5 匹ずつの PARTIAL サンプルングを実施した。各時点で顔面静脈にアニマルランセットを穿刺し、EDTA-2K 抗凝固処理済みの採血管を用いて、約 50-70 μL 採血した。採取した血液はチューブに移して速やかに氷冷し、遠心分離 ($9,000\times g$ 、2 分、約 4°C) して上清 (血漿) を新しいチューブに約 10-20 μL 採取した。血漿は移管まで -80°C フリーザーにて凍結保存した。

血漿は 85%アセトニトリルによる抽出及び C18 カートリッジによる精製を実施した後、高速液体クロマトグラフ-質量分析計

(LC-MS/MS) によって ENB 濃度を測定した。糞中 ENB 濃度測定

溶媒対照群で投与時~2 時間後、他 2 群で投与から 4 時間後~8 時間後及び 8 時間後~24 時間後の間に排泄された全ての糞を対象とした。採取した糞は重量を測定し、チューブに移して -80°C フリーザーにて凍結保存した。

抽出については、チューブに 85%アセトニトリルを添加した後、チューブ内で糞をよく

破碎し、遠心後 (9,000×g、2分、約4°C)、上清の試験溶液を回収した。次いで、C18カートリッジを用いて精製し、LC-MS/MSによってENB濃度を測定した。

薬物動態パラメータの算出

各時点の平均濃度に基づき、最高血中濃度 (C_{max})、最高血中濃度到達時間 (t_{max})、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を求めた。最終測定時点以降の AUC については、無限大時間までの外挿により算出した。また、静脈内投与後データでは時間 0 への外挿を行った。経口投与群及び尾静脈内投与群における AUC から、バイオアベイラビリティを推定した。

遺伝子発現解析

ENB による代謝関連遺伝子の転写レベルの発現変化を検出するために、溶媒対照群と経口投与群の肝臓サンプルを用いて遺伝子発現解析を行った。RNeasy Mini キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて組織試料から total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、RNA-Seq 解析 (n=5/グループ、1 サンプルとしてプール) に使用した。TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep Kit (イルミナ株式会社) を用いて、メーカーのプロトコルに従ってサンプル調製を行い、配列決定には Illumina NovaSeq 6000 を用いた。溶媒対照群と比較して Fold Change (絶対値) ≥ 2 かつ p-value < 0.05 で発現量が増加または減少している遺伝子を選別し、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), version 6.8 により Gene Ontology (GO) に基づくエンリッチメント解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律 (動愛法) を遵守し、実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文部科学省告示第

71 号)、厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針 (厚生労働省通知 科発 0601002 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) の指針およびガイドラインに即して設けられた東京農工大学実験動物取り扱い倫理規程に則り、東京農工大学動物実験小委員会の了承を得て適切に動物実験を実施した。

C. 研究結果

一般状態及び体重

いずれの群においても変化は認められなかった。

血中 ENB 濃度

経口投与群において、サンプル処理の誤りのため 1 サンプルを解析から除外した。また、尾静脈投与群では血中から被験物質が検出されなかった 3 サンプルを解析から除外した。したがって、サンプル数は溶媒対照群、経口投与群、尾静脈投与群でそれぞれ 5、9、7 であった。サンプリングデータを Table 2 及び Table 3 に示した。

糞中 ENB 濃度

上記のサンプル除外により、サンプル数は溶媒対照群、経口投与群、尾静脈内投与群でそれぞれ 5、4、4 であった。経口投与群において、ENB 投与量の平均 5.26% の ENB が検出された。尾静脈内投与群ではごく微量の ENB が検出されるのみであった (Table 4)。

ENB の薬物動態

各時点の平均濃度に基づいて、薬物動態パラメータを算出した。経口投与群において、 C_{max} は 1024 ng/mL、 t_{max} は投与後 1 時間、AUC は 6008 ng·hr/mL と算出された。尾静脈内投与群における AUC は 234 ng·hr/mL と算出された。投与用量は経口投与群が 30 mg/kg、尾静脈内投与群が 1 mg/kg であるが、線形動態に従い、AUC が投与量に比例して増加すると仮定した

場合、バイオアベイラビリティは 85.6%と推定された。

RNA-Seq 解析

経口投与群では、溶媒対照群と比較して、553 遺伝子の発現が増加した。発現が増加した遺伝子の GO term に基づいたエンリッチメント解析では、有機物、窒素化合物及び薬物等に対する反応や、代謝プロセスの制御に関連した GO が濃縮された (Table 5)。発現が増加した遺伝子群には、シトクローム P450 をコードする遺伝子が多く含まれていた (*Cyp1b1*、*Cyp2a5*、*Cyp2b10*、*Cyp2a12*、*Cyp7a1*、*Cyp21a1*、*Cyp26a1*)。

D. 考察

本試験では、マウスにおける高い経口バイオアベイラビリティ (85.6%) が確認された。経口投与群の糞中には ENB が検出されたが、ENB 投与量の平均 5.3%であった。また、肝臓の遺伝子発現解析ではシトクローム P450 をコードした遺伝子を含む、多くの代謝関連遺伝子の発現が ENB の経口投与によって増加することが明らかになった。したがって、ENB がマウスの経口投与によって十分に吸収され、肝臓における代謝を受けた可能性が示唆された。全身循環前の代謝 (presystemic metabolism) の存在や ATP Binding Cassette トランスポーターの発現が吸収に影響を与えることから、ENB は個体及び動物種ごとに異なる複雑な動態を示す可能性があることが指摘されている (Fraeyman et al., 2017)。本試験と相反して、ブロイラーにおける ENB の経口投与後の低い吸収性が報告されているが、上記のような種差や生体内変化の違いが影響している可能性が考えられる。

2019 年度には ENs 混合物 (B、B1、A1) の、2020 年度には ENB 単体の 28 日間反復経口投与試験を実施したが、いずれも明らかな毒性は検出されなかった。マウスでは経口投与により ENB が十分に吸収されることを勘案すると、ENB の毒性が当初の想定と比較して低い可能性がある。以上より、ENB は経口投与により吸収されるものの、一般毒性は今回用いた用量より高い用量で出現するものと考えられた。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Okano, H., Okamura, T., Takahashi, Y., Takashima, K., Ojiro, R., Tang, Q., Jin, M., Kikuchi, S., Ogawa, B., Yoshida, T., Yoshinari, T., Shibutani, M.: A 28-day repeated oral dose toxicity study of enniatin complex in mice. *J. Toxicol. Sci.* 46(4), 157–165, 2021.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数
溶媒 対照群	0	0	5	雄	5
経口 投与群	30	6	5	雄	10
尾静脈内 投与群	1	0.2	5	雄	10

Table 2. 経口投与群における血中 ENB 濃度

ID	血中 ENB 濃度 (ng/mL)								
	投与前	投与後							
		5 min	10 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr
1	BLQ	221	–	790	–	1357	–	–	–
2	BLQ	58	–	432	–	434	–	–	–
3	BLQ	85	–	569	–	258	–	–	–
4	BLQ	189	–	667	–	1068	–	–	–
5	BLQ	163	–	313	–	513	–	–	–
6		–	273	–	918	–	480	237	22
7		–	209	–	1608	–	553	66	BLQ
8		–	214	–	551	–	961	181	138
9		–	194	–	1023	–	648	141	BLQ
MEAN		143	222	554	1025	726	660	156	40
SD		69	35	188	438	465	212	72	66

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation; ENB, enniatin B.

Table 3. 尾静脈内投与群における血中 ENB 濃度

ID	血中 ENB 濃度 (ng/mL)								
	投与前	投与後							
		5 min	10 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr
1	BLQ	245	–	71	–	28	–	–	–
2	BLQ	211	–	61	–	27	–	–	–
3	BLQ	231	–	103	–	29	–	–	–
4		–	94	–	41	–	BLQ	BLQ	BLQ
5		–	81	–	BLQ	–	BLQ	BLQ	BLQ
6		–	96	–	BLQ	–	BLQ	BLQ	BLQ
7		–	48	–	18	–	BLQ	BLQ	BLQ
MEAN		229	80	78	15	28	–	–	–
SD		17	22	22	19	1	–	–	–

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation; ENB, enniatin B.

Table 4. 糞中 ENB 濃度

	溶媒対照群	経口投与群 (ENB 30 mg/kg)			尾静脈内投与群 (ENB 1mg/kg)	
		投与後				
	0-2 hr	4-8 hr	8-24 hr	4-8 hr	8-24 hr	
動物数	5	4	4	4	4	
糞量 (mg)	95.5 ± 24.2	89.0 ± 71.2	225.0 ± 159.8	198.3 ± 94.7	552.0 ± 246.4	
糞中 ENB 濃度 (ng/mg)	BLQ	228.3 ± 140.3	218.6 ± 373.0	0.02 ± 0.01	BLQ	
糞中 ENB 量 (ng)	–	19110 ± 15000	28211 ± 42935	4.7 ± 5.1	–	
糞中総 ENB 量/投与量 (%)	–	5.26 ± 6.44		0.02 ± 0.02		

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation; ENB, enniatin B.

Table 5. 発現増加した遺伝子群の代謝機能に関連する GO term

GO Accession	GO term	No. of genes	P value
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	89	2.67E-14
GO:0010033	response to organic substance	129	3.87E-14
GO:0014070	response to organic cyclic compound	65	4.35E-14
GO:0009628	response to abiotic stimulus	70	6.36E-14
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	114	1.60E-12
GO:0033993	response to lipid	61	2.60E-12
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	122	2.78E-11
GO:0071310	cellular response to organic substance	94	1.02E-10
GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	113	1.69E-10
GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	112	6.19E-10
GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	76	1.95E-09
GO:1901698	response to nitrogen compound	55	2.75E-09
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	112	2.95E-09
GO:0006793	phosphorus metabolic process	112	3.17E-09
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	98	2.61E-08
GO:0042493	response to drug	32	3.54E-08
GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process	90	1.78E-07
GO:0071417	cellular response to organonitrogen compound	31	3.33E-06
GO:0051173	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	69	5.27E-06
GO:1901699	cellular response to nitrogen compound	33	8.58E-06