

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)

総合研究報告書

エンニアチン類の毒性試験  
(2019～2021 年度)

研究分担者 渋谷 淳 東京農工大学大学院

研究要旨

日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究の一端として、エンニアチン類についての毒性情報を得るため、2019 年度にはエンニアチン類混合物のマウスを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。最高用量を 20 mg/kg、公比 5、溶媒対照群を含む 4 用量群を設定し、一般状態観察、体重、摂餌量測定、投与期間終了後の血液・血液化学検査、剖検、病理組織学検査を実施したが、高用量群の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられたのみでその他の検査項目にエンニアチンの影響と考えられる変化は認められなかった。2020 年度にはエンニアチン B のマウスを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。最高用量を 30 mg/kg、公比 2、溶媒対照群を含む 4 用量群を設定し、一般状態観察、体重、摂餌量測定、投与期間終了後の血液・血液化学検査、剖検、病理組織学検査を実施したところ、エンニアチン B 投与群で摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められた。しかしながら、病理組織学的検査においてエンニアチン B の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は最高用量の 30 mg/kg となった。上記 2 試験で明らかな毒性が検出されない原因として、エンニアチン B の吸収性が低い可能性が考えられたため、2021 年度にはマウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験と肝臓の遺伝子発現解析を実施した。エンニアチン B の血中動態解析から、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エンニアチン B 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、エンニアチン B 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、エンニアチン B の毒性が当初の想定と比較して低い可能性があり、エンニアチン B 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エンニアチン類が検出されており、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、マウスを用いたエンニアチン B 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、無毒性量が求められている。しかし、公比が大きいかつ用量依存性の乏しいデータが多く、より正確な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。

そこで、2019 年度にマウスのエンニアチン類混合物 (エンニアチン B : エンニアチン B1 : エンニアチン A1 = 4 : 4 : 1) の 28 日間反復経口投与毒性試験を、2020 年度にエンニアチン B 単体を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。2021 年度には、マウスにおけるエンニアチン B の経口投与後の吸収性を把握することを目的に、マウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験を実施した。また、エンニアチン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

### <2019 年度>

#### (1) 動物実験

動物実験は株式会社ボゾリサーチセンターに委託し実施した。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。バリア動物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±3°C、湿度 50±20% の制御環境下で個別に飼育した。実験期間中は固形飼料 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。

エンニアチン類混合物 (B : B1 : A1 = 4 : 4 : 1) を Dimethyl sulfoxide 加コーン油で調製した被験液を 0, 0.8, 4, 20 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雌雄各 10 匹/群) に 28 日間反復経口投与した。エンニアチン B の 42 日間反復投与毒性試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) では、エンニアチンの影響と考えられる変化として雌に胸腺、子宮、脾臓の組織形態学的な変化、雄に十二指腸腸上皮細胞の空胞化や脳酸化ストレス量の増加が観察されており、それらの変化を以て上記の投与量が設定された。群構成表を Table 1 に示した。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重量測定後、固定し、パラフィン包埋した。死亡例については発見後速やかに剖検を実施したが採血及び臓器重量の測定は行わなかった。各臓器のヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色標本を作製し、鏡検した。

#### (2) 一般状態の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び 1~3 時間後の間に、剖検日は動物搬出前に 1 回実施した。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。

#### (3) 体重測定

投与期間中は投与 1, 4 及び 7 日、以降は 7 日ごとに毎週 1 回、剖検日は動物搬出前に実施した。全動物について 07:00~12:30 の間に測定した。剖検日には相対器官重量算出のため、体重 (非絶食) を測定した。

死亡・瀕死期剖検動物については、搬出前に測定した。また、投与期間中の体重増加量（投与1日から投与28日）を算出した。

#### （4）摂餌量測定

投与1、4及び7日、以降は7日ごとに毎週1回実施した。全動物について07:00~12:30の間に給餌量/残餌量を測定した。投与開始日の測定は前日からの1日量、投与4及び7日は3日間の累積摂取量、その後は7日ごとに7日間の累積摂取量に基づいて、1匹当たりの1日摂餌量を算出した。

#### （5）血液学検査

計画剖検時に、全動物（非絶食）をイソフルラン麻酔下で開腹し、ヘパリンナトリウムで処理したシリンジを用いて後大静脈から全採血し、一部（約0.3 mL）をEDTA-2K加採血瓶（BDマイクロティナMAP：日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に採取した。得られた血液についてTable 2に記載した項目及び方法で検査した。

#### （6）血液化学検査

血液学検査用試料の採取後に残った血液（約0.4 mL）をヘパリン加試験管（キャピジェクトIIヘパリンリチウム：テルモ株式会社）に移し、遠心分離（3,100 rpm、1,690×g、12分間）し、得られた血漿についてTable 3に記載の項目及び方法により検査した。

#### （7）剖検、器官重量測定

全ての計画剖検動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、外表及び全ての器官/組織を詳細に観察した。死亡動物は、発見後速やかに剖検を行った。全ての計画剖検動物について、Table 4に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重100 g当たりの相対重量を算出した。両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。死亡動物の器官重量測定は行わなかった。

#### （8）病理組織学検査

全ての動物について、Table 4に示した対象器官/組織をリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した。ただし、眼球及び視神経はリン酸緩衝3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定、精巣及び精巣上体はブアン液で固定後、リン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した。全ての動物の検査対象器官/組織についてパラフィン包埋し、H・E染色標本を作製した。作製した全てのH・E染色標本について鏡検を実施した。

#### （9）統計解析

計量データ（体重/体重増加量、摂餌量、血液学検査、血液化学検査及び器官重量）についてSAS Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）を用いて溶媒対照群と各被験物質投与群との間で検定を行った。Bartlett検定で等分散性を確認した後、Dunnnettの検定あるいはSteelの検定を行った。

（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」（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）に従い動物福祉に考慮し実施された。

#### <2020年度>

##### （1）動物実験

動物実験は株式会社ボゾリサーチセンターに委託し実施した。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。バリア動物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±3°C、湿度50±20%の制御環境下で個別に飼育した。実験期間中は固形飼料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。

エンニアチン B を dimethyl sulfoxide 添加コーン油で調製した被験液を 0、7.5、15、30 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス（雌雄各 10 匹/群）に 28 日間反復経口投与した。エンニアチン B の 42 日間反復投与毒性試験（Maranghi et al., EFSA, 2018）において、18 mg/kg 群で有意な体重増加抑制が観察されている。また 2019 年度の試験では、投与に起因した変化として高用量群（20 mg/kg）の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられた。本試験では、上記 2 試験との投与期間や被験物質の違いを考慮して 30 mg/kg 体重を最高投与量として設定した。群構成表を Table 5 に示した。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液生化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重量測定後、固定し、パラフィン包埋した。各臓器のヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本を作製し、鏡検した。

一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液化学検査、剖検、器官重量測定、病理組織学検査、統計解析については、2019 年度と同様に行った。

## <2021 年度>

### （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±2°C、湿度 50±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）、エンニアチン B 30 mg/kg-経口投与群（10 匹）及びエンニアチン B 1 mg/kg-静脈内投与群（10 匹）の 3 群構成とした（Table 6）。溶媒は 6%濃度の dimethyl sulfoxide 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エンニアチン B を経口又は尾静脈内投与し、血中エンニアチン B 濃度測定のために各時点において血液を採取した。また、糞中エンニアチン B 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<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> ガスによる深麻酔下で腹大動脈から放血死させた。

### （2）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。

### （3）血中エンニアチン B 濃度測定

採血はエンニアチン B 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 サンプルリングを実施した。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×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、LC-MS/MS によってエンニアチン B 濃度を測定した。

#### (4) 糞中エンニアチン B 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℃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℃)、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 によってエンニアチン B 濃度を測定した。

#### (5) 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。

#### (6) 遺伝子発現解析

エンニアチン B 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が行われた。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) に使用された。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)  $\geq 2$  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

#### <2019 年度>

##### (1) 一般状態の観察

投与 22 日と 23 日に高用量群の雄 1 例 (動物番号: 4010) に自発運動の減少と皮膚の退色がみられた。同動物は投与 24 日に死亡した。

##### (2) 体重測定

投与期間中の体重、体重増加量共にいずれの群にも有意な変化は認められなかった (Table 7)。

##### (3) 摂餌量測定

雄では投与 4 日の中・高用量群、投与 14 日の高用量群に対照群と比較し低値がみられた。雌では投与 4、14、21 日の高用量群に対照群と比較し低値がみられた (Table 8)。

#### (4) 血液学検査

いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった (Table 9)。

#### (5) 血液化学検査

いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった (Table 10)。

#### (6) 剖検 (肉眼所見)

高用量群の雄死亡例 (動物番号: 4010) に、皮膚の蒼白化、全身諸臓器の退色、左腋窩部皮下の暗赤色巣 (1カ所、25×20 mm)、左上腕部の暗赤色化がみられた。計画剖検では溶媒対照群の雌 1 例 (動物番号: 1102) に肝臓の一部暗調化がみられた (Table 11)。

#### (7) 器官重量

中用量群の雄の脳絶対重量が対照群と比較し低値を示した。その他の臓器の絶対重量や相対重量に有意な変化は認められなかった (Table 12)。

#### (8) 病理組織学検査

計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性的変化がみられたが、被験物質の投与に起因すると考えられる変化はみられなかった (Table 13)。剖検時にみられた死亡例の左腋窩部皮下の暗赤色巣と左上腕部の暗赤色化は、病理組織学的に出血だった。また、出血による状態悪化が原因と考えられるリンパ系組織の萎縮が同動物に認められた。計画剖検時に溶媒対照群の雌 1 例にみられた肝臓の一部暗調化は病理組織学的に壊死であった。

### <2020 年度>

#### (1) 一般状態の観察

いずれの群においても変化は認められなかった。

#### (2) 体重の変化

いずれの群においても投与期間中の体重に有意な変化は認められなかった (Table 14)。

#### (3) 摂餌量の変化

雄では投与 1 日の高用量群、投与 14 日の低・高用量群、投与 21 日の中・高用量群、投与 28 日の高用量群に対照群と比較し高値がみられた。雌では投与 14 日の低用量群、投与 21 日の低用量群、投与 28 日の低・高用量群に対照群と比較し低値がみられた (Table 14)。

#### (4) 血液学検査結果

雄では高用量群に RBC 値の低値が認められた。雌ではいずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった (Table 15)。

#### (5) 血液化学検査

雄では高用量群に BUN 値の高値が認められた。雌ではいずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった (Table 16)。

#### (6) 剖検 (肉眼所見)

計画剖検では低用量群の雄 1 例 (動物番号: 2002) に精巣の白色巣、低用量群の雌 1 例 (動物番号: 2103) に肝臓の白色巣、中用量群の雄 1 例 (動物番号: 3003) に膝関節の隆起巣、高用量群の雄 1 例 (動物番号: 4004) に精巣の小型化がみられた (Table 17)。

#### (7) 器官重量測定結果

高用量群の雄の腎臓絶対重量が対照群と比較し高値を示した。その他の臓器の絶対重量や相対重量に有意な変化は認められなかった (Table 18)。

#### (8) 病理組織学検査結果

計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性的変化がみられたが、被験物質の投与に起因すると考えられる変化はみられなかった (Table 19)。計画剖検時に低用量群の雄 1 例にみられた精巣の白色巣は精液瘤、低用量群の雌 1 例にみられた肝臓の白色巣は壊死、中用量群の雄 1 例にみられた膝関節の隆起巣は仮骨形成、高用量群の雄 1 例にみられた精巣の小型化は精細管の変性/萎縮であった。

### <2021 年度>

#### (1) 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。

#### (2) 血中エンニアチン B 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 20 及び Table 21 に示した。

#### (3) 糞中エンニアチン B 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、エンニアチン B 投与量の平均 5.26% のエンニアチン B が検出された。尾静脈内投与群ではごく微量のエンニアチン B が検出されるのみであった (Table 22)。

#### (4) エンニアチン B 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。

#### (5) 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 23)。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

2019 年度では被験物質の影響と考えられる変化として摂餌量の低値が認められたものの、病理組織学的検査をはじめとするその他の検査項目に被験物質の影響を示唆する明らかな変化は認められなかった。本試験はエンニアチン類の混合物を用いており、EFSA が公表した、マウスを用いたエンニアチン B の 42 日間の反復投与試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) との被験物質の違いが結果に影響した可能性が示唆された。

2020 年度にはエンニアチン B 単体を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。本試験では被験物質の影響と考えられる変化として、摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められた。しかしながら、剖検時に血液学及び血液化学検査結果と符号する肉眼所見は得られず、また病理組織学的検査においても被験物質の影響を示唆する明らかな変化は認められなかった。したがって、最小毒性量を求めることは出来ず、無毒性量は 30 mg/kg という結果となった。エンニアチン B はブロイ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。

2021 年度は、マウスにおけるエンニアチン B の経口投与後の吸収性を把握することを目的に、マウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験を実施した。エンニアチン B の血中動態解析からは、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エンニアチン B が検出されたが、エンニアチン B 投与量の平均 5.26% 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エンニアチン B 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、エンニアチン B 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、エンニアチン B 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エンニアチン B 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た。

上述のように、2019 年度及び 2020 年度に実施した 28 日間反復経口投与試験では、いずれも明らかな毒性が検出されなかった。これらの結果と、マウスでは経口投与によりエンニアチン B が十分に吸収されることを勘案すると、エンニアチン B の毒性が当初の想定と比較して低い可能性が示唆された。以上より、エンニアチン B 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（エンニアチン類混合物の 28 日間反復経口投与試験）

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
溶媒 対照群	0	0	5	雄	10	1001~1010
				雌	10	1101~1110
低用量群	0.8	0.16	5	雄	10	2001~2010
				雌	10	2101~2110
中用量群	4	0.8	5	雄	10	3001~3010
				雌	10	3101~3110
高用量群	20	4	5	雄	10	4001~4010
				雌	10	4101~4110

Table 2. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
赤血球数 (RBC)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> (E4)/μL
ヘモグロビン濃度 (HGB)	シアンメトヘモグロビン変法 <sup>a)</sup>	g/dL
ヘマトクリット値 (HCT)	RBC 及び MCV から算出 <sup>a)</sup>	%
平均赤血球容積 (MCV)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	fL
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	RBC 及び HGB から算出 <sup>a)</sup>	pg
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	HGB 及び HCT から算出 <sup>a)</sup>	g/dL
赤血球容積分布幅 (RDW)	赤血球容積ヒストグラムの標準偏差と MCV から算出 <sup>a)</sup>	%
網赤血球数 (Retic)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>9</sup> (E9)/L
血小板数 (PLT)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> (E4)/μL
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>2</sup> (E2)/μL
白血球分類 <sup>注</sup>	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>2</sup> (E2)/μL
使用測定機器		
<sup>a)</sup> : 総合血液学検査装置 アドヴィア 120 又は 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)		
注: リンパ球 (LYMP)、好中球 (NEUT)、好酸球 (EOS)、好塩基球 (BASO)、単球 (MONO) 及び大型非染色球 (LUC)		

Table 3. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
アルカリホスファターゼ (ALP)	Bessey-Lowry 法 <sup>a)</sup>	IU/L
トリグリセライド (TG)	LPL-GK-GPO-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
グルコース (GLU)	グルコースデヒドロゲナーゼ法 <sup>a)</sup>	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-LEDH 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
総タンパク質 (TP)	Biuret 法 <sup>a)</sup>	g/dL
アルブミン (ALB)	BCG 法 <sup>a)</sup>	g/dL
A/G 比 (A/G)	総タンパク質及びアルブミンから算出	
使用測定機器		
<sup>a)</sup> : 臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形 (キャノンメディカルシステムズ株式会社)		

Table 4. 病理学検査対象器官/組織

組 織	H・E 標本作製	重量測定
大脳	√	√ (脳として)
小脳	√	
脊髄 (胸部)	√	
坐骨神経	√*	
眼球	√	
視神経	√	
ハーダー腺	√	
下垂体	√	
甲状腺	√	
上皮小体	√*#	
副腎	√	
胸腺	√	√
脾臓	√	√
顎下リンパ節	√*	
腸間膜リンパ節	√	
心臓	√	√
胸大動脈	√	
気管	√	
肺 (気管支を含む)	√	√
舌	√	
食道	√	
胃	√	
十二指腸	√	
空腸	√	
回腸 (パイエル板を含む)	√	
盲腸	√	
結腸	√	
直腸	√	
顎下腺	√	
舌下腺	√	
肝臓	√	√ (肝臓として)
胆嚢	√	
膵臓	√	
腎臓	√	√
膀胱	√	
精巣/卵巣	√/√	√/√
精巣上体/子宮	√/√	√/√
前立腺/陰	√/√	
精嚢 (凝固腺を含む)	√	
乳腺 (鼠径部、雌のみ)	√*	
胸骨 (骨髄を含む)	√	
大腿骨 (膝関節及び骨髄を含む)	√*	

組 織	H・E 標本作製	重量測定
大腿部骨格筋	√*	
皮膚（鼠径部）	√*	
肉眼的異常部位	√	
喉頭		（保存のみ）
鼻腔		（保存のみ）
個体識別部（耳標を装着した耳介）		（保存のみ）

各項目該当ある場合は√で示す。

\*：両側を摘出し、片側を標本作製する（他の両側性器官は両側を鏡検）。

#：上皮小体は微小な器官であるため両側の標本作製を試みる。各群 80%以上の動物で片側（左を優先）の鏡検

が可能と判断される場合、標本の再作製は行わない。

Table 5. 群構成表（エンニアチン B の 28 日間反復経口投与試験）

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
溶媒 対照群	0	0	5	雄	10	1001~1010
				雌	10	1101~1110
低用量群	7.5	1.5	5	雄	10	2001~2010
				雌	10	2101~2110
中用量群	15	3	5	雄	10	3001~3010
				雌	10	3101~3110
高用量群	30	6	5	雄	10	4001~4010
				雌	10	4101~4110

Table 6. 群構成表 (エンニアチン B の薬物動態試験)

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 7. 体重測定

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10 (9 <sup>b</sup> )
Body weight (g)	Day 1	32.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	31.6 ± 1.3	31.9 ± 1.3	31.3 ± 1.0
	Day 4	32.6 ± 1.7	32.1 ± 1.2	32.2 ± 1.4	32.1 ± 1.0
	Day 7	32.8 ± 1.5	32.5 ± 1.2	32.3 ± 1.3	32.6 ± 1.2
	Day 14	34.2 ± 1.5	33.8 ± 1.2	33.8 ± 1.5	34.1 ± 1.1
	Day 21	35.1 ± 1.6	34.8 ± 1.2	34.7 ± 1.3	35.5 ± 1.5
	Day 28	36.2 ± 1.7	35.7 ± 1.2	35.9 ± 1.7	36.1 ± 1.8 <sup>b</sup>
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	23.7 ± 1.0	23.6 ± 1.2	23.9 ± 1.2	23.3 ± 1.1
	Day 4	24.3 ± 1.3	24.0 ± 1.3	24.3 ± 1.1	23.9 ± 1.0
	Day 7	24.2 ± 1.2	24.6 ± 1.2	24.6 ± 0.8	23.9 ± 1.3
	Day 14	25.8 ± 1.1	25.6 ± 1.6	25.8 ± 1.2	25.5 ± 1.5
	Day 21	26.4 ± 0.9	27.0 ± 1.5	26.7 ± 1.2	26.3 ± 1.4
	Day 28	27.4 ± 1.1	27.8 ± 1.5	27.4 ± 1.2	27.2 ± 1.6

<sup>a</sup> Mean ± SD.

<sup>b</sup> One animal (animal No. 4010) was found dead on the 24th day of administration, so 9 animals were examined.



Table 8. 摂餌量測定

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10 (9 <sup>b</sup> )
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	5.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.4	5.2 ± 0.6
	Day 4	5.0 ± 0.5	4.7 ± 0.3	4.6 ± 0.3 <sup>*</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>*</sup>
	Day 7	4.9 ± 0.4	5.0 ± 1.0	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.5
	Day 14	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.9	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.2 <sup>*</sup>
	Day 21	4.8 ± 0.8	5.3 ± 2.8	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.5
	Day 28	5.0 ± 0.6	5.8 ± 3.5	4.9 ± 1.1	4.5 ± 0.3
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.7 ± 0.6	4.6 ± 0.7	5.0 ± 0.6	4.6 ± 0.8
	Day 4	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.8	3.8 ± 0.5 <sup>*</sup>
	Day 7	4.5 ± 0.7	4.7 ± 0.5	4.6 ± 0.8	3.8 ± 0.5
	Day 14	4.6 ± 0.3	4.9 ± 0.7	4.5 ± 0.5	4.0 ± 0.3 <sup>**</sup>
	Day 21	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.6	4.6 ± 0.4	4.2 ± 0.3 <sup>*</sup>
	Day 28	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.3 ± 0.4

<sup>a</sup> Mean ± SD.

<sup>b</sup> One animal (animal No. 4010) was found dead on the 24th day of administration, so 9 animals were examined.

<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , significantly different from control group (Dunnett's test, two-side).

Table 9. 血液学検査

	Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.8	4	20
<b>Males</b>				
No. of animals examined	10	10	10	9
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )	927 $\pm$ 61 <sup>a</sup>	929 $\pm$ 67	924 $\pm$ 53	918 $\pm$ 45
Hemoglobin (g/dL)	13.8 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.9	13.9 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)	46.1 $\pm$ 1.5	46.8 $\pm$ 2.9	46.7 $\pm$ 1.9	45.8 $\pm$ 2.2
MCV (fL)	49.8 $\pm$ 2.2	50.4 $\pm$ 1.2	50.6 $\pm$ 1.5	50.0 $\pm$ 1.5
MCH (pg)	14.9 $\pm$ 0.7	15.1 $\pm$ 0.5	15.1 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 0.4
MCHC (g/dL)	30.0 $\pm$ 0.5	29.9 $\pm$ 0.6	29.9 $\pm$ 0.5	29.9 $\pm$ 0.3
RDW (%)	12.4 $\pm$ 0.5	12.5 $\pm$ 0.7	12.4 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.3
Reticulocyte ( $10^9/\text{L}$ )	337.6 $\pm$ 42.3	331.4 $\pm$ 43.6	319.6 $\pm$ 27.1	312.9 $\pm$ 29.4
Platelets ( $10^4/\mu\text{L}$ )	124.6 $\pm$ 9.7	117.5 $\pm$ 13.0	121.3 $\pm$ 12.4	121.8 $\pm$ 13.0
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )	54.0 $\pm$ 18.5	59.2 $\pm$ 18.5	50.5 $\pm$ 18.0	53.9 $\pm$ 15.5
Differential leukocyte counts ( $10^2/\mu\text{L}$ )				
Eosinophils	1.3 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5
Neutrophils	10.7 $\pm$ 5.3	11.4 $\pm$ 4.3	8.1 $\pm$ 4.1	10.7 $\pm$ 5.2
Lymphocytes	40.7 $\pm$ 17.6	44.7 $\pm$ 14.7	40.2 $\pm$ 14.3	40.6 $\pm$ 11.1
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Monocytes	0.9 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.4
Large unstained cells	0.3 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2
<b>Females</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )	919 $\pm$ 45	892 $\pm$ 40	893 $\pm$ 33	903 $\pm$ 52
Hemoglobin (g/dL)	14.1 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.6	13.7 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.7
Hematocrit (%)	47.1 $\pm$ 1.5	46.7 $\pm$ 1.9	46.1 $\pm$ 1.5	46.2 $\pm$ 2.2
MCV (fL)	51.4 $\pm$ 1.4	52.4 $\pm$ 1.2	51.7 $\pm$ 1.1	51.3 $\pm$ 1.9
MCH (pg)	15.4 $\pm$ 0.5	15.7 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 0.5
MCHC (g/dL)	29.9 $\pm$ 0.7	30.0 $\pm$ 0.5	29.7 $\pm$ 0.5	30.3 $\pm$ 0.4
RDW (%)	13.0 $\pm$ 0.5	13.3 $\pm$ 0.5	13.3 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.5
Reticulocyte ( $10^9/\text{L}$ )	309.8 $\pm$ 50.2	346.6 $\pm$ 82.6	338.3 $\pm$ 38.3	324.7 $\pm$ 54.0
Platelets ( $10^4/\mu\text{L}$ )	113.8 $\pm$ 15.8	110.4 $\pm$ 9.3	113.1 $\pm$ 12.4	107.8 $\pm$ 13.2
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )	49.3 $\pm$ 20.9	46.3 $\pm$ 18.5	43.6 $\pm$ 18.1	45.3 $\pm$ 15.7
Differential leukocyte counts ( $10^2/\mu\text{L}$ )				
Eosinophils	1.2 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.7
Neutrophils	8.2 $\pm$ 4.4	7.3 $\pm$ 4.1	7.0 $\pm$ 2.8	9.9 $\pm$ 9.7
Lymphocytes	38.9 $\pm$ 16.5	36.5 $\pm$ 15.4	34.7 $\pm$ 15.6	33.3 $\pm$ 11.9
Basophils	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Monocytes	0.6 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.4
Large unstained cells	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD.

Table 10. 血液化学検査

	Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.8	4	20
<b>Males</b>				
No. of animals examined	10	10	10	9
TP (g/dL)	5.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2
Alb (g/dL)	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1
A/G ratio	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2
AST (IU/L)	44 ± 7	39 ± 5	42 ± 6	39 ± 3
ALT (IU/L)	30 ± 7	30 ± 7	32 ± 13	29 ± 6
LDH (IU/L)	190 ± 65	175 ± 48	181 ± 38	200 ± 63
ALP (IU/L)	227 ± 69	249 ± 84	238 ± 71	213 ± 45
TG (mg/dL)	85 ± 32	104 ± 42	87 ± 28	88 ± 22
Glucose (mg/dL)	211 ± 20	194 ± 17	210 ± 21	198 ± 14
BUN (mg/dL)	22 ± 3	24 ± 3	24 ± 4	25 ± 4
CRN (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.03
<b>Females</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
TP (g/dL)	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.4
Alb (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2
A/G ratio	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2
AST (IU/L)	54 ± 9	51 ± 7	47 ± 6	53 ± 11
ALT (IU/L)	29 ± 7	26 ± 6	25 ± 6	30 ± 7
LDH (IU/L)	180 ± 51	188 ± 60	179 ± 43	168 ± 42
ALP (IU/L)	352 ± 75	302 ± 79	310 ± 78	317 ± 51
TG (mg/dL)	68 ± 25	87 ± 22	68 ± 32	67 ± 35
Glucose (mg/dL)	174 ± 12	179 ± 12	182 ± 19	174 ± 18
BUN (mg/dL)	24 ± 4	23 ± 5	22 ± 4	22 ± 5
CRN (mg/dL)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Table 11. 剖検（肉眼所見）

	Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.8	4	20
Male (Found dead)				
No. of animals examined	0	0	0	1
Whole animal				
Discoloration, pale, skin	0 <sup>a</sup>	0	0	1
Discoloration, pale, all tissue	0	0	0	1
Skin				
Focus, dark red, subcutaneous	0	0	0	1
Arm				
Discoloration, dark red	0	0	0	1
Males (End of administration)				
No. of animals examined	10	10	10	9
All tissues				
Not remarkable	10	10	10	9
Females (End of administration)				
No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues				
Not remarkable	9	10	10	10
Liver				
Discoloration, dark, partial	1	10	10	10

<sup>a</sup>The number of animals with lesions.

Table 12. 器官重量

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
<b>Males</b>					
No. of animals examined		10	10	10	9
Body weight	(g)	36.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	36.0 ± 1.3	36.2 ± 1.3	36.4 ± 1.7
Brain	(mg)	496 ± 21	494 ± 18	494 ± 15	493 ± 32
	(mg/100g)	1360 ± 86	1373 ± 50	1365 ± 41	1356 ± 69
Thymus	(mg)	45 ± 10	41 ± 6	41 ± 7	45 ± 11
	(mg/100g)	122 ± 26	115 ± 17	113 ± 15	123 ± 33
Heart	(mg)	165 ± 12	163 ± 8	160 ± 10	164 ± 20
	(mg/100g)	451 ± 28	453 ± 16	443 ± 25	452 ± 48
Lung	(mg)	192 ± 10	194 ± 10	197 ± 10	200 ± 6
	(mg/100g)	527 ± 27	539 ± 24	545 ± 31	551 ± 24
Liver	(g)	2.05 ± 0.16	2.09 ± 0.11	2.06 ± 0.12	2.14 ± 0.15
	(g/100g)	5.6 ± 0.28	5.81 ± 0.22	5.69 ± 0.35	5.88 ± 0.26
Spleen	(mg)	94 ± 22	97 ± 15	98 ± 12	96 ± 12
	(mg/100g)	257 ± 52	268 ± 40	272 ± 36	265 ± 31
Kidneys	(mg)	522 ± 66	530 ± 42	513 ± 28	556 ± 29
	(mg/100g)	1426 ± 145	1471 ± 81	1419 ± 89	1529 ± 77
Testes	(mg)	262 ± 30	233 ± 24	280 ± 25	245 ± 42
	(mg/100g)	719 ± 97	646 ± 68	774 ± 68	675 ± 119
Epididymides	(mg)	92 ± 8	97 ± 8	95 ± 6	93 ± 12
	(mg/100g)	252 ± 20	270 ± 17	264 ± 16	257 ± 35
<b>Females</b>					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight	(g)	27.5 ± 1.0	27.8 ± 1.7	27.2 ± 1.5	26.7 ± 1.8
Brain	(mg)	489 ± 17	487 ± 18	469 ± 15 <sup>*</sup>	484 ± 20
	(mg/100g)	1779 ± 52	1754 ± 105	1733 ± 118	1819 ± 116
Thymus	(mg)	53 ± 10	51 ± 15	52 ± 13	51 ± 8
	(mg/100g)	192 ± 37	184 ± 50	192 ± 46	193 ± 42
Heart	(mg)	137 ± 15	137 ± 15	133 ± 9	132 ± 6
	(mg/100g)	497 ± 42	491 ± 38	489 ± 37	496 ± 45
Lung	(mg)	170 ± 6	172 ± 9	169 ± 8	167 ± 12
	(mg/100g)	618 ± 29	617 ± 36	624 ± 44	628 ± 50
Liver	(g)	1.51 ± 0.10	1.55 ± 0.17	1.47 ± 0.11	1.43 ± 0.17
	(g/100g)	5.5 ± 0.29	5.55 ± 0.37	5.42 ± 0.25	5.33 ± 0.36
Spleen	(mg)	101 ± 9	104 ± 19	95 ± 15	98 ± 18
	(mg/100g)	366 ± 25	376 ± 73	351 ± 60	369 ± 68
Kidneys	(mg)	351 ± 29	371 ± 31	342 ± 27	337 ± 21
	(mg/100g)	1277 ± 96	1333 ± 107	1262 ± 121	1262 ± 53
Ovaries	(mg)	12.9 ± 3.6	13.7 ± 1.9	12.0 ± 5.6	11.7 ± 3.1
	(mg/100g)	46.6 ± 12.4	49.3 ± 5.8	44.1 ± 20	43.7 ± 10.7
Uterus	(mg)	158 ± 40	164 ± 58	160 ± 71	168 ± 51
	(mg/100g)	575 ± 150	589 ± 209	586 ± 247	629 ± 187

<sup>a</sup> Mean ± SD.<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , significantly different from control group (Dunnett's test, two-side).

Table 13. 病理組織学検査

	Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.8	4	20
Male (Found dead)				
No. of animals examined	0	0	0	1
Lymph node, mesenteric				
Atrophy	0 <sup>a</sup>	0	0	1
mild	0	0	0	1
Lymph node, submandibular				
Atrophy	0	0	0	1
mild				
Spleen				
Atrophy, white pulp	0	0	0	1
mild	0	0	0	1
Thymus				
Atrophy	0	0	0	1
mild	0	0	0	1
Skin				
hemorrhage	0	0	0	1 <sup>b</sup>
moderate	0	0	0	1
Males (End of administration)				
No. of animals examined	10	10	10	9
Glandular stomach				
Dilatation, gland	1	0	0	0
minimal	1	0	0	0
Cyst, glandular	0	1	0	1
minimal	0	1	0	1
Kidney				
Basophilia, tubule	1	0	3	1
minimal	1	0	3	1
Cyst	0	1	1	1
minimal	0	1	1	1
Mineralization, intraluminal	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Liver				
Infiltrate, mixed, inflammatory cell	1	0	1	2
minimal	1	0	1	2
Necrosis, focal	0	1	0	0
minimal	0	1	0	0
Females				
No. of animals examined	10	10	10	10
Glandular stomach				
Dilatation, gland	0	0	1	0
minimal	0	0	1	0
Cyst	0	0	1	0
minimal	0	0	1	0
Kidney				
Basophilia, tubule	2	2	2	1
minimal	2	2	2	1
Cyst	1	1	0	1
minimal	1	1	0	1
Liver				
Infiltrate, mixed, inflammatory cell	2	0	2	0
minimal	2	0	2	0
Necrosis	1 <sup>b</sup>	0	0	0
moderate	1	0	0	1
Ovary				
Cyst, rete ovarii	1	0	0	0
minimal	1	0	0	0

<sup>a</sup>The number of animals with lesions.

<sup>b</sup>Lesions with gross findings.

Table 14. 体重・摂餌量の変化

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	28.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	29.0 ± 1.3	28.8 ± 1.1	29.0 ± 1.0
	Day 4	29.5 ± 1.6	30.1 ± 1.7	29.1 ± 1.2	29.7 ± 1.0
	Day 7	30.2 ± 1.5	31.4 ± 1.9	30.0 ± 1.1	30.4 ± 1.2
	Day 14	31.0 ± 1.5	32.4 ± 2.4	31.3 ± 1.4	31.6 ± 1.1
	Day 21	31.7 ± 2.0	33.0 ± 2.3	32.5 ± 1.6	32.8 ± 1.5
	Day 28	32.4 ± 2.1	34.0 ± 2.5	33.2 ± 1.5	33.6 ± 1.8
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.5 ± 0.6	4.7 ± 0.5	4.9 ± 0.5	5.1 ± 0.4*
	Day 4	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.6 ± 0.5
	Day 7	4.1 ± 0.5	4.5 ± 0.5	4.3 ± 0.6	4.6 ± 0.3
	Day 14	3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.4*	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.2*
	Day 21	3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4**	4.4 ± 0.3**
	Day 28	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4*
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	23.1 ± 1.3	23.2 ± 1.7	23.0 ± 1.8	23.1 ± 0.9
	Day 4	23.4 ± 1.2	23.3 ± 1.6	23.4 ± 1.5	23.4 ± 1.2
	Day 7	23.9 ± 1.2	23.4 ± 1.5	23.8 ± 1.8	24.3 ± 1.0
	Day 14	25.0 ± 1.4	24.2 ± 1.5	25.2 ± 1.8	25.2 ± 1.3
	Day 21	26.0 ± 1.7	25.4 ± 1.0	26.0 ± 1.8	26.0 ± 1.4
	Day 28	26.6 ± 2.1	26.0 ± 1.3	26.7 ± 1.9	26.7 ± 1.5
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.3 ± 0.6	3.9 ± 0.8	3.9 ± 0.5	3.9 ± 0.4
	Day 4	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.3
	Day 7	4.0 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.9 ± 0.6	3.8 ± 0.5
	Day 14	4.3 ± 0.4	3.7 ± 0.3**	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.2
	Day 21	4.5 ± 0.6	3.8 ± 0.3**	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3
	Day 28	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.3**	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.4*

<sup>a</sup> Mean ± SD.\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Table 15. 血液学検査結果

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )		928 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	913 $\pm$ 35	912 $\pm$ 60	880 $\pm$ 32*
Hemoglobin (g/dL)		14.3 $\pm$ 0.7	14.2 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.7	13.7 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)		47.3 $\pm$ 2.1	46.8 $\pm$ 1.5	46.3 $\pm$ 1.9	45.6 $\pm$ 1.6
MCV (fL)		51.0 $\pm$ 0.7	51.3 $\pm$ 1.1	50.9 $\pm$ 2.4	51.9 $\pm$ 1.3
MCH (pg)		15.4 $\pm$ 0.3	15.6 $\pm$ 0.4	15.3 $\pm$ 0.7	15.6 $\pm$ 0.4
MCHC (g/dL)		30.2 $\pm$ 0.4	30.4 $\pm$ 0.3	30.0 $\pm$ 0.4	30.1 $\pm$ 0.5
RDW (%)		12.2 $\pm$ 0.4	12.3 $\pm$ 0.4	12.5 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.4
Reticulocytes ( $10^9/\text{L}$ )		318.3 $\pm$ 35.6	325.3 $\pm$ 32.0	332.9 $\pm$ 41.0	330.4 $\pm$ 30.9
Platelets ( $10^4/\mu\text{L}$ )		121.5 $\pm$ 10.0	124.1 $\pm$ 14.4	118.5 $\pm$ 11.0	117.4 $\pm$ 11.9
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )		42.7 $\pm$ 14.6	57.4 $\pm$ 24.8	55.0 $\pm$ 22.3	51.5 $\pm$ 23.3
Differential leukocyte counts ( $10^2/\mu\text{L}$ )					
Lymphocytes		32.6 $\pm$ 13.0	45.0 $\pm$ 21.4	38.5 $\pm$ 16.4	41.0 $\pm$ 18.8
Neutrophils		7.6 $\pm$ 2.1	9.4 $\pm$ 3.6	13.3 $\pm$ 12.1	7.7 $\pm$ 3.6
Eosinophils		1.4 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.8
Basophils		0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Monocytes		0.9 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5
Large unstained cells		0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.3
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )		936 $\pm$ 57	903 $\pm$ 27	929 $\pm$ 52	921 $\pm$ 37
Hemoglobin (g/dL)		14.9 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.7	14.6 $\pm$ 0.4
Hematocrit (%)		48.9 $\pm$ 1.9	47.4 $\pm$ 1.5	48.1 $\pm$ 2.4	48.1 $\pm$ 1.4
MCV (fL)		52.3 $\pm$ 1.7	52.5 $\pm$ 0.9	51.9 $\pm$ 0.7	52.2 $\pm$ 1.3
MCH (pg)		15.9 $\pm$ 0.5	16.0 $\pm$ 0.4	15.7 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.5
MCHC (g/dL)		30.4 $\pm$ 0.5	30.5 $\pm$ 0.5	30.3 $\pm$ 0.5	30.5 $\pm$ 0.6
RDW (%)		13.1 $\pm$ 0.5	13.1 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 0.4	13.0 $\pm$ 0.5
Reticulocytes ( $10^9/\text{L}$ )		363.3 $\pm$ 47.8	362.8 $\pm$ 70.9	337.0 $\pm$ 64.6	358.6 $\pm$ 45.4
Platelets ( $10^4/\mu\text{L}$ )		101.0 $\pm$ 12.0	101.1 $\pm$ 8.2	107.2 $\pm$ 16.9	109.1 $\pm$ 8.8
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )		53.7 $\pm$ 12.0	44.9 $\pm$ 12.7	44.3 $\pm$ 14.5	43.4 $\pm$ 6.4
Differential leukocyte counts ( $10^2/\mu\text{L}$ )					
Lymphocytes		41.8 $\pm$ 11.0	35.3 $\pm$ 10.8	35.2 $\pm$ 12.0	33.3 $\pm$ 4.9
Neutrophils		8.9 $\pm$ 2.9	6.9 $\pm$ 2.4	6.6 $\pm$ 3.0	7.5 $\pm$ 1.8
Eosinophils		1.7 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4
Basophils		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Monocytes		0.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.5
Large unstained cells		0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Abbreviations: MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, red blood cell count; RDW, red blood cell distribution width; WBC, white blood cell count.



Table 16. 血液化学検査結果

	Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
	0 (control)	7.5	15	30
<b>Males</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	4.9±0.1 <sup>a</sup>	5.1±0.02	5.0±0.2	4.8±0.1
Albumin (g/dL)	3.3±0.2	3.4±0.3	3.3±0.3	3.2±0.1
A/G ratio	2.0±0.3	2.0±0.2	2.0±0.3	1.9±0.1
AST (IU/L)	39±6	46±11	42±10	39±7
ALT (IU/L)	29±5	39±19	31±5	31±13
LDH (IU/L)	175±65	196±40	199±64	194±54
ALP (IU/L)	216±59	229±56	209±58	256±57
Triglyceride (mg/dL)	80±24	94±28	76±37	101±19
Glucose (mg/dL)	204±16	207±22	202±22	202±28
BUN (mg/dL)	22±3	25±5	26±3	26±5*
Creatinine (mg/dL)	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.12±0.02
<b>Females</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	5.0±0.2	4.8±0.2	4.9±0.2	4.9±0.2
Albumin (g/dL)	3.6±0.2	3.5±0.1	3.7±0.2	3.5±0.2
A/G ratio	2.7±0.2	2.8±0.2	2.9±0.3*	2.7±0.2
AST (IU/L)	47±7	47±10	46±12	49±9
ALT (IU/L)	26±4	28±9	26±8	31±11
LDH (IU/L)	157±53	163±56	161±50	145±39
ALP (IU/L)	310±67	337±77	283±46	327±86
Triglyceride (mg/dL)	78±29	66±12	82±30	76±32
Glucose (mg/dL)	178±21	180±11	172±17	174±18
BUN (mg/dL)	22±4	22±2	21±3	20±3
Creatinine (mg/dL)	0.11±0.02	0.11±0.03	0.11±0.03	0.11±0.02

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Abbreviations: A/G, albumin/globulin; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; LDH, lactate dehydrogenase.

Table 17. 剖検所見：肉眼所見

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues					
	Not remarkable	10 <sup>a</sup>	9	9	9
Testes					
	Focus, white	0	1	0	0
	Small	0	0	0	1
Knee joint					
	Focus, raised	0	0	1	0
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues					
	Not remarkable	9	10	10	10
Liver					
	Focus, white	1	0	0	0

<sup>a</sup>The number of animals with lesions.

Table 18. 剖検時器官重量

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	32.8±2.2 <sup>a</sup>	34.4±2.6	33.6±1.7	34.0±1.9
Brain	(mg)	476±16	476±32	477±27	470±30
	(mg/100g BW)	1460±109	1391±119	1425±122	1385±99
Thymus	(mg)	37±7	44±13	38±6	41±8
	(mg/100g BW)	113±19	130±41	114±15	121±26
Heart	(mg)	153±31	151±15	153±10	152±10
	(mg/100g BW)	465±68	441±34	458±38	449±24
Lungs	(mg)	169±11	177±14	178±13	177±10
	(mg/100g BW)	517±36	515±36	531±31	522±25
Liver	(g)	1.75±0.11	1.86±0.19	1.88±0.21	1.90±0.13
	(g/100g BW)	5.33±0.30	5.39±0.27	5.59±0.49	5.59±0.31
Spleen	(mg)	81±13	91±18	92±18	96±12
	(mg/100g BW)	247±26	264±41	273±43	282±34
Kidneys	(mg)	430±30	471±45	470±33	487±62*
	(mg/100g BW)	1315±101	1372±89	1401±132	1435±170
Testes	(mg)	231±23	239±30	241±29	209±60
	(mg/100g BW)	705±53	698±95	716±70	615±173
Epididymides	(mg)	88±8	88±4	85±6	86±9
	(mg/100g BW)	268±17	257±21	254±17	255±28
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	26.6±2.2	26.5±1.5	27.2±1.7	26.5±1.5
Brain	(mg)	475±28	479±27	471±24	474±35
	(mg/100g BW)	1791±124	1811±81	1734±73	1791±99
Thymus	(mg)	52±14	59±9	50±7	46±9
	(mg/100g BW)	193±46	221±34	186±30	175±33
Heart	(mg)	131±15	121±10	129±13	129±14
	(mg/100g BW)	494±58	456±23	476±46	487±43
Lungs	(mg)	165±10	169±14	170±16	165±15
	(mg/100g BW)	621±35	636±28	623±34	621±35
Liver	(g)	1.46±0.18	1.45±0.14	1.47±0.10	1.42±0.18
	(g/100g BW)	5.47±0.33	5.48±0.38	5.41±0.24	5.34±0.50
Spleen	(mg)	100±15	113±17	101±11	100±17
	(mg/100g BW)	374±43	426±55*	370±36	375±48
Kidneys	(mg)	343±37	320±20	333±44	329±27
	(mg/100g BW)	1287±74	1207±49	1222±100	1244±113
Ovaries	(mg)	12.0±2.9	10.0±2.7	9.8±2.2	11.8±4.5
	(mg/100g BW)	45.2±11.1	37.6±8.4	35.9±7.8	44.0±15.0
Uterus	(mg)	141±40	143±35	150±40	148±40
	(mg/100g BW)	524±111	539±123	556±159	558±140

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: BW, body weight.

\**P* < 0.05, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Table 19. 病理組織学検査

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (control)	7.5	15	30
Males (End of administration)					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Eye					
	Retinal rosettes	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
Glandular stomach					
	Dilatation, gland	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	0	1	1	1
	minimal	0	1	1	1
	Cyst	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Mineralization, intraluminal	1	0	1	2
	minimal	1	0	1	2
Liver					
	Necrosis, focal	0	0	1	1
	minimal	0	0	1	1
Testis					
	Spermatocele	0	2 <sup>b</sup>	0	0
	minimal	0	2	0	0
	Degeneration/atrophy, tubule	0	0	0	1 <sup>b</sup>
	mild	0	0	0	1
Bone, femur (knee joint)					
	Callus	0	0	1 <sup>b</sup>	0
	moderate	0	0	1	0
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Eye					
	Retinal rosettes	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Harderian gland					
	Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	1	0	1	0
	minimal	1	0	1	0
	Mineralization, intraluminal	1	1	1	0
	minimal	1	1	1	0
	Dilation, tubule	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Microabscess	0	0	0	1
	minimal	0	0	0	1
Liver					
	Infiltrate, mixed, inflammatory cell	1	3	1	1
	minimal	1	2	1	1
	mild	0	1	0	0
	Necrosis	0	1 <sup>b</sup>	0	0
	moderate	0	1	0	0

<sup>a</sup> The number of animals with findings.

<sup>b</sup> Lesions with gross findings.

Criterion of the lesions were selected from minimal, mild, moderate or severe.

Table 20. 経口投与群における血中エンニアチン B 濃度

ID	血中濃度 (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.

Table 21. 尾静脈内投与群における血中エンニアチン B 濃度

ID	血中濃度 (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.

Table 22. 糞中エンニアチン B 濃度

	溶媒対照群	経口投与群 (30 mg/kg)			尾静脈内投与群 (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 <sup>a</sup>	89.0±71.2	225.0±159.8	198.3 ± 94.7	552.0 ± 246.4	
糞中濃度 (ng/mg)	BLQ	228.3±140.3	218.6±373.0	0.02 ± 0.01	BLQ	
糞中量 (ng)	–	19110±15000	28211 ± 42935	4.7 ± 5.1	–	
糞中総量/投与量 (%)	–	5.26 ± 6.44		0.02 ± 0.02		

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation.

Table 23. 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