

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

モニリフォルミンの Maus 単回及び 14 日間反復投与毒性試験

分担研究者 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、新興カビ毒の一つであるモニリフォルミンについての毒性情報を得る為、モニリフォルミンの Maus を用いた一般毒性試験を実施する目的で、単回及び 14 日間反復経口投与毒性試験を実施した。単回投与試験では、文献値を参考に最高用量を 80 mg/kg とし、公比 2、溶媒対照群を含む 4 用量群を設定して投与し、投与後 24 時間、一般状態を観察後、剖検、病理組織学検査を実施したところ、最高用量群で投与後 1-2 時間で死亡及び瀕死例が認められ、LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であった。また、病理組織学的検査において 40 mg/kg 以上の投与群の腎臓で皮質深部を中心に近位尿細管の壊死が認められた。次いで 14 日間反復投与試験では、この試験結果を参考として最高用量を 40 mg/kg、公比 2、溶媒対照群を含む 3 用量群を設定して投与を行い、一般状態観察、体重、摂餌量測定、剖検、病理組織学検査を実施した。その結果、投与期間中の一般状態及び体重に変化は認められなかったが、病理組織学検査において 20 mg/kg 以上の投与群の腎臓で皮質深部を中心に再生尿細管が認められた。今後は Maus を用いた 28 日間反復投与毒性試験及び腎尿細管壊死の機序解明試験を実施する予定である。

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、歴史的には、カビ毒に汚染された食品の急性摂取による中毒症状や慢性的な摂取による臓器障害が引き起こされている。また、動物実験の実施により腫瘍誘発性が証明されたことで、発がん性等の毒性が懸念されている。これまで厚生労働科学研究において、平成13年度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ている。

近年、新興カビ毒と呼ばれる今まで見られてこなかった一群の新たなカビ毒の存在が注目されてきている。発見は数十年前であり、当時は汚染物質として認知されていなかったものの、近年の分析法の発展によって食品を汚染している実態が明らかになった。モニリフォルミン (MON) は、新興カビ毒に分類される化合物で、平成29年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) の評価結果において、実験動物において致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。

既存のマウスを用いた MON の毒性試験 (Burmeister ら、1980) では、単回経口投与毒性試験における LD₅₀ 値が 47.6 mg/kg (体重 20 g と仮定して約 1 mg/animal/day) であったのに対し、21 日間反復飲水投与毒性試験においては上記 LD₅₀ 値の約 3 倍の摂取量に相当する 2.9 mg/animal/day の飲水投与用量群においても、有意な体重増加量の減少が認められたのみであり、一貫した結果が得られていない。そのため、EFSA による MON のリスク評価 (EFSA, 2018) において

マウスの毒性情報は考慮されていない。

そこで本分担研究では、マウスを用いた MON の単回及び一般毒性試験を実施し、毒性兆候及び無毒性量等、リスク評価に必要な毒性情報を取得することを目的とした。本年度は、今後実施する 28 日間反復毒性試験の用量設定のための予備検討として、マウスを用いた単回及び 14 日間反復投与試験を実施した。

B. 研究方法

<単回投与試験>

動物実験

5 週齢の雄マウス (ICR [CrI:CD1 (ICR)]) をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、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。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±3°C、湿度 50±20% の制御環境下で飼育した。飼育期間中は 1 ケージあたり 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。

MON (UkrOrgSyntez Ltd. から購入した化学合成品) を蒸留水に溶解し調製した被験液を 0、20、40、80 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雄 5 匹/群) に 5 mL/kg の容量で単回経口投与した。群構成表を Table 1 に示す。投与前後に各動物の生死及び一般状態を観察し、投与から約 24 時間後に剖検を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。Table 2 に示す所定の臓器を採取後、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

投与前、投与直後及び1、2、3、4、6、8、10及び24時間後に実施した。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。

剖検

投与から約24時間後に剖検を実施した。但し、死亡または瀕死状態の個体は、発見後速やかに剖検に供した。死亡動物を除く全ての動物をイソフルランによる吸入麻酔下での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。

病理組織学検査

全ての動物について、Table 2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。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。

統計解析

IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation) を用いてLD₅₀値を算出した。

<14日間反復投与試験>

動物実験

5週齢の雄マウス(ICR [CrI:CD1 (ICR)])をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、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。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±3°C、湿度50±20%の制御環境下で飼育した。飼育期間中は1ケージあたり3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。

MONを蒸留水に溶解し調製した被験液を0、20、40 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ6週齢ICR [CrI:CD1 (ICR)]マウス(雄3匹/群)に5 mL/kgの容量で14日間反復経口投与した。群構成表をTable 6に示す。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。最終投与の翌日に剖検を実施した。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

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。

体重測定

投与期間中は投与1、4、7、10及び13日の投与前、剖検日は動物搬出前に実施した。全動物について08:00~12:00の間に測定した。

摂餌量測定

投与1、4、7、10及び13日の投与前、剖検日は動物搬出前に実施した。ケージ毎に08:00~12:00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、7、10及び13日は3日間の累積摂取量、剖検日は2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。

剖検

最終投与の翌日に剖検を実施した。全ての動物をイソフルランによる吸入麻酔下で

の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。

病理組織学検査

全ての動物について、Table 7 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。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。

統計解析

体重について IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation) 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。Levene の検定で等分散性を確認した後、Dunnnett の検定あるいは Bonferroni 補正を用いた Aspin-Welch の t 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（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）の指針及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

<単回投与試験>

一般状態の観察

投与後 1 時間までに 40 mg/kg 投与群の 1

例（動物番号：305）及び 80 mg/kg 投与群の全例で自発運動の低下が認められた。40 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：305）では、投与後 2 時間で状態の回復が認められた。一方で、投与後 1~2 時間に 80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：405）で死亡、3 例（動物番号：401、402、404）で瀕死状態が認められたため、当該動物については速やかに剖検に供した。80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：403）では、投与後 3 時間には状態の回復が認められた（Table 3）。概略の LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であった。

剖検（肉眼所見）

剖検では 80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：403）に消化管のうっ血、80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：402）に左心房の拡大がみられた（Table 4）。

病理組織学検査結果

腎臓に被験物質の投与に起因すると考えられる変化が認められた（Table 5）。すなわち 40 mg/kg 投与群の 3 例及び 80 mg/kg 投与群の 2 例で皮質深部を中心とした近位尿細管の壊死、80 mg/kg 投与群の 3 例でうっ血が認められた。80 mg/kg 投与群で剖検時に消化管のうっ血と左心房の拡大が 1 例ずつ認められたが、組織学的な著変は見出されなかった。

<14 日間反復投与試験>

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。

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 8）。

摂餌量の変化

いずれの群においても投与期間中の摂餌量に顕著な変化は認められなかった (Table 8)。

剖検 (肉眼所見)

剖検時の肉眼所見に投与による影響は認められなかった (Table 9)。

病理組織学検査結果

腎臓に被験物質の投与に起因すると考えられる変化が認められた (Table 10)。すなわち 20 mg/kg 投与群の 1 例及び 40 mg/kg 投与群の全例で皮質深部を中心に再生尿細管が認められた。

D. 考察

本単回投与試験の結果求められた LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であり、過去に 0、10、20、40 及び 80 mg/kg の投与量で実施されたマウスを用いた MON の単回経口投与毒性試験

(Burmeister ら、1980) における LD₅₀ 値 47.6 mg/kg と概ね一致した結果が得られた。引き続いて実施された 14 日間反復投与試験では、単回投与試験の結果を基に 40 mg/kg を最高用量として設定して、動物試験を実施した。MON 投与の影響と考えられる変化として、単回投与試験では腎臓の皮質深部を中心とした近位尿細管の急性尿細管壊死が認められ、これに対する反応性変化として、14 日間反復投与試験では再生尿細管が認められたものと考えられた。なお、単回経口投与毒性試験及び 14 日反復投与試験で認められたその他の所見については、用量依存性が認められなかったことから自然発生性または偶発性変化であると考えられた。

また、ラットを用いた MON の 12 週間反復混餌投与試験 (Kriek ら、1977) において、

当該試験の最低用量である混餌濃度 2% (約 17 mg/kg 相当) 以上の投与量で、心筋の変性・壊死・線維化が認められることが報告されているが、マウスを用いた本試験において心筋の病変は認められなかった。また、ラットを用いた 12 週間試験では (Kriek ら、1977)、2% 混餌濃度において好中球の貪食活性の低下も認めているが、EFSA によるレビューでは、本パラメーターについては信頼性の観点からリスク評価に用いられていない。以上より、マウスにおける MON の毒性標的臓器は、腎臓である可能性が示唆されたが、単回投与毒性試験で認められた急性尿細管壊死が MON 投与後の全身性ショック時の有効循環血量の低下に起因する虚血性の皮質壊死に相当するのか、あるいは、MON の腎尿細管における代謝の際生じる活性中間代謝産物等の毒性に起因するかどうかについては、今後検討をする必要がある。

また、来年度に実施予定であるマウスを用いた 28 日間反復投与毒性試験は、40 mg/kg を最高用量とし、公比 2-3 で 3 段階の用量の投与群構成とすることで、マウスにおける MON の毒性兆候及び無毒性量に関する情報を得ることが可能であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

「Oral pharmacokinetics and general toxicity after 28-day repeated oral doses of enniatin B in mice.」 Ryota Ojira, Hiromu Okano, Shunsuke Ozawa, Kazumi Takashima, Yasunori Takahashi, Qian Tang, Xinyu Zou, Toshinori Yoshida,

Tomoya Yoshinari, Makoto Shibutani (尾城 椋太、岡野 拓、小澤俊介、高嶋和巳、高橋康徳、唐 倩、鄒 昕羽、吉田敏則、吉成知也、渋谷 淳：新興カビ毒エンニアチンBのマウスにおける薬物動態と28日間反復投与による一般毒性について.)

The 10th ASVP and 10th JCVP Joint Conference. (The 10th conference of Asian Society of Veterinary Pathology and the 10th Annual Meeting of Japanese College of Veterinary Pathologists Joint Conference.) PC-15, p.177.

March 29-31, 2023.

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－単回投与試験

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	5	101 - 105
低用量群	20	4	5	雄	5	201 - 205
中用量群	40	8	5	雄	5	301 - 305
高用量群	80	16	5	雄	5	401 - 405

Table 2. 病理組織学検査対象器官/組織—単回投与試験

組 織	H・E 標本作製
副腎	√
胸腺	√
脾臓	√
顎下リンパ節	√
腸間膜リンパ節	√
心臓	√
肺（気管支を含む）	√
胃	√
十二指腸	√
空腸	√
回腸（パイエル板を含む）	√
盲腸	√
結腸	√
直腸	√
肝臓	√
腎臓	√

各項目該当ある場合は√で示す。

Table 3. 一般状態－単回投与試験

	Animal No.	Clinical observations								
		Pre-dosing	1h	2h	3h	4h	6h	8h	10h	24h
Control	101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D.W.	102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	104	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	105	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Moniliformin	201	N	N	N	N	N	N	N	N
20 mg/kg	202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	204	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	205	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Moniliformin	301	N	N	N	N	N	N	N	N
40 mg/kg	302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	304	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	305	N	Decrease in locomotor activity	N	N	N	N	N	N	N
	Moniliformin	401	N	Decrease in locomotor activity	Moribundity	-	-	-	-	-
80 mg/kg	402	N	Decrease in locomotor activity	Moribundity	-	-	-	-	-	-
	403	N	Decrease in locomotor activity	Decrease in locomotor activity	N	N	N	N	N	N
	404	N	Decrease in locomotor activity	Moribundity	-	-	-	-	-	-
	405	N	Decrease in locomotor activity	Death	-	-	-	-	-	-

N : No abnormalities.

Table 4. 剖検所見：肉眼所見－単回投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (Control)	20	40	80
No. of animals examined	5	5	5	5
All tissues				
Not remarkable	5 ^a	5	5	3
Heart				
Enlargement, Atrium, left	0	0	0	1
Intestine				
Congestion	0	0	0	1

^a The number of animals with lesions.

Table 5. 病理組織学検査—単回投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (Control)	20	40	80
No. of animals examined	5	5	5	5
Kidney				
Necrosis, tubule	0 ^a	0	3	2
minimal	0	0	3	1
moderate	0	0	0	1
Congestion	0	0	0	3
minimal	0	0	0	3
Heart				
Infiltrate, mixed inflammatory cell	0	1	0	1
minimal	0	1	0	1
Liver				
Necrosis, focal	0	0	0	1
moderate	0	0	0	1
Single cell necrosis	1	0	0	1
minimal	1	0	0	1
Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	0	1	2
minimal	1	0	1	2
Fatty change, hepatocyte	0	0	0	2
severe	0	0	0	2
Hemorrhage	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Lung				
Granuloma, focal	0	0	0	1
mild	0	0	0	1
Abscess	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Edema	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Glandular stomach				
Dilatation, gland	0	1	0	0
minimal	0	1	0	0

^a The number of animals with findings.

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

Table 5. 病理組織学検査－単回投与試験（続き）

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (Control)	20	40	80
No. of animals examined	5	5	5	5
Lymph node				
Single cell necrosis	0	0	0	3
minimal	0	0	0	2
mild	0	0	0	1
Hemorrhage	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Infiltrate, neutrophil	0	1	0	0
mild	0	1	0	0

Table 6. 群構成表－14日間反復投与試験

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	3	101－103
低用量群	20	4	5	雄	3	201－203
高用量群	40	8	5	雄	3	301－303

Table 7. 病理組織学検査対象器官/組織－14日間反復投与試験

組 織	H・E 標本作製
副腎	√
胸腺	√
脾臓	√
顎下リンパ節	√
腸間膜リンパ節	√
心臓	√
肺（気管支を含む）	√
胃	√
十二指腸	√
空腸	√
回腸（パイエル板を含む）	√
盲腸	√
結腸	√
直腸	√
肝臓	√
腎臓	√

各項目該当ある場合は√で示す。

Table 8. 体重・摂餌量の変化－14日間反復投与試験

		Dose of moniliformin (mg/kg/day)		
		0 (Control)	20	40
No. of animals examined		3	3	3
Body weight (g)	Day 1	29.0 ± 1.3 ^a	30.1 ± 1.7	28.7 ± 0.4
	Day 4	29.8 ± 2.0	30.7 ± 2.0	30.2 ± 0.6
	Day 7	30.1 ± 2.4	31.7 ± 2.6	31.4 ± 0.8
	Day 10	29.7 ± 2.4	31.3 ± 2.8	31.0 ± 1.1
	Day 13	30.8 ± 2.1	32.5 ± 3.0	32.3 ± 1.2
	Day 15	31.4 ± 2.3	32.7 ± 3.0	32.9 ± 1.7
	Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.6	5.0
Day 4		4.9	4.5	4.3
Day 7		4.8	4.5	4.8
Day 10		5.3	4.7	4.8
Day 13		5.3	4.1	4.5
Day 15		5.3	4.3	4.4

^a Mean ± SD.

*P < 0.05, **P < 0.01, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Aspin Welch's t-test with Bonferroni correction.

Table 9. 剖検所見：肉眼所見－14日間反復投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)		
	0 (Control)	20	40
No. of animals examined	3	3	3
All tissues			
Not remarkable	3 ^a	3	3

^a The number of animals with lesions.

Table 10. 病理組織学検査－14日間反復投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)		
	0 (Control)	20	40
No. of animals examined	3	3	3
Kidney			
Regeneration, tubule	0 ^a	1	3
Minimal	0	1	2
Mild	0	0	1
Dilatation, tubule	0	1	0
Minimal	0	1	0
Microgranuloma	1	1	0
Minimal	1	1	0
Liver			
Single cell necrosis	1	1	0
Minimal	1	1	0
Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	1	0
minimal	1	1	0
Thymus			
Infiltrate, neutrophil	0	0	1
minimal	0	0	1
Glandular stomach			
Infiltrate, mixed inflammatory cell	0	0	1
minimal	0	0	1

^a The number of animals with findings.

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