

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

分担研究報告書

毒性試験 (マウスにおけるモニリフォルミンの腎毒性機序解明試験)

研究分担者 渋谷 淳 (東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門)

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 (MON) についての毒性情報を得るために、令和 4 年度及び 5 年度にマウスを用いた MON の単回投与試験と一般毒性試験をそれぞれ実施したところ、腎臓にそれぞれ尿細管壊死と再生尿細管が誘発された。そこで令和 6 年度では、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。MON を 40 mg/kg 体重で単回投与した後の腎皮質における RNA シーケンシング解析により、*Cyp3a13*、*Cyp26b1*、*Cyp4f15* などの代謝反応関連遺伝子、及び酸化ストレス関連遺伝子 *Gpx7* の発現が上昇することが明らかになった。IV 型 collagen に対する免疫組織化学的解析では、MON 投与による壊死尿細管において基底膜の保持が確認された。これらの結果は、MON はマウスの腎臓を標的とし、経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

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、歴史的にカビ毒に汚染された食品により、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。動物実験の実施により腫瘍誘発性が証明されるようになり、発がん性等の毒性が懸念されてきている。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垣間見

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、当時は健康危害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ことが明らかになってきたカビ毒の総称であり、国際的な関心が高まっている。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述の 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軽微な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) においても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、マウスにおける MON の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。昨年度までにマウスを用いた MON の単回投与試験、14 日間反復投与試験、及び 28 日間反復試験を実施したところ、単回投与試験では腎臓皮質深部における急性尿細管壊死、14 日間及び 28 日間反復投与試験では同部位における再生尿細管が認められ、マウスにおいて MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆された。今年度は MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的とし、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。

B. 研究方法

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。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。

群構成は溶媒対照群 (6 匹) 及び MON 40 mg/kg-投与群 (12 匹) の 2 群構成とした。溶

媒は Milli-Q 水を用いた。実験期間中は一般状態の観察を行い、投与から 6 時間後に各群 6 匹を剖検し、腎臓を採材して重量を測定した後、半割して一方を組織学的検査に、もう一方を遺伝子発現解析に供した。投与から 24 時間後に MON 投与群の残りの 6 匹を剖検し、腎臓を採材して重量を測定した後、半割して一方を組織学的検査に、もう一方を免疫組織化学的解析に供した。

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。

病理組織学検査

被験液投与 6 及び 24 時間後の半割した腎臓をリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド液で固定した。標準の手順でパラフィン包埋して H・E 染色標本を作製し、鏡検を実施した。

遺伝子発現解析

MON 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 MON 投与群の腎臓サンプルを用いて遺伝子発現解析を実施した。メタカーン固定した腎臓から、Fig. 1 に示すように皮質組織を採材し、RNeasy Mini キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、RNA-Seq 解析 (N=6/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) により Gene Ontology に基づく機能アノテーション解析を行った。

免疫組織化学的解析

壊死尿細管における基底膜の有無を確認するために、一次抗体として IV 型 collagen (1:100 希釈; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; Cat. No. PA1-28534) を用いた。抗原性賦活化処理として、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 121°C, 10 分の条件で熱処理を加えた。一次抗体の添加前に 0.3% 過酸化水素を含むメタノール中に 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。シグナル検出は Vectastain® Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用い、3,3'-diaminobenzidine/過酸化水素を用いて可視化した後、ヘマトキシリンで対比染色を施し、鏡検に供した。

統計解析

計量データについて溶媒対照群と MON 投与群との間で検定を行った。Levene 検定で等分散性を確認した後、Dunnett の検定あるいは Bonferroni 補正を用いた Aspin-Welch の *t* 検定を行った。統計解析には IBMSPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation) を用いた。

(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

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。

腎臓重量

いずれの群においても変化は認められなかった (Table 1)。

病理組織学検査結果

被験液投与 6 時間後では、溶媒対照群と MON 投与群のいずれにおいても明らかな病理組織学変化は認められなかった。MON 投与 24 時間後では、2 例の皮質に尿細管壊死が認められた (Fig. 2)。

RNA-Seq 解析データ

MON 投与群では、溶媒対照群と比較して、397 遺伝子の発現が増加し、321 遺伝子の発現が減少した。遺伝子オントロジーに基づく機能アノテーション解析により、MON を 40 mg/kg 体重で単回経口投与した 6 時間後に発現が有意に増加した遺伝子は、多くの機能グループを形成していることが明らかになった。腎皮質で発現が増加した代表的な遺伝子クラスターは、外部刺激に対する応答、すなわち、*Ces1g*、*Cyp26b1*、*Plxna3*、*Ren1*、*Rest*、細胞移動、すなわち、*Egr1*、*Plxna3*、*Rnd1*、免疫系プロセスの制御、すなわち、*Cyp26b1*、*P4htm*、*Tnfrsf13b*、脂質結合、すなわち、*Cyp4f15*；レチノイド代謝プロセス、ジテルペノイド代謝プロセス、およびテルペノイド代謝プロセス、

すなわち *Cyp26b1*、*Cyp3a13*、および *Ttr*；ステロイド代謝プロセス、すなわち *Ces1g*、*Cyp26b1*、*Cyp3a13*、*Egr1*、*Hsd17b14*、および *Rest*；同一タンパク質結合、すなわち *Apobec2*；および細胞外領域、すなわち *Gpx7* が含まれていた (Table 2)。発現が減少した遺伝子群に、特徴的な遺伝子は含まれていなかった。

免疫組織化学的解析結果

MON 投与群で認められた壊死尿細管において IV 型 collagen 陽性を示す基底膜が観察された (Fig. 2)。

D. 考察

MON の急性経口毒性試験では、40 mg/kg 体重以上の MON を投与されたマウスの腎皮質に、局所的な近位尿細管壊死が散見された。80 mg/kg 体重の MON を単回投与したところ、5 匹中 4 匹に死亡または瀕死がみられたことから、MON の毒性による急性心不全の誘発が示唆された。急性心不全は、急性尿細管壊死または腎皮質壊死を引き起こすことが知られている (Di Lullo et al., 2017)。しかし、全身循環障害に起因するこれらのタイプの尿細管壊死は、尿細管基底膜の破壊の有無にかかわらず、近位尿細管の不規則な壊死 (急性尿細管壊死) または両側皮質の全部または一部の壊死 (腎皮質壊死) をもたらす可能性がある (Cianciolo and Mohr, 2015)。したがって、本研究における MON 投与後の局所的尿細管壊死の分布における散在パターンは、有効循環血量の低下に起因する虚血性の尿細管壊死とは区別される。さらに、14 日間及び 28 日間の反復経口投与毒性試験では、40 mg/kg 体重 MON/日の投与により、腎皮質における尿細管再生の発生頻度の増加が認められた。しかし、これらの試験では、尿細管基底膜の破壊による尿細管再生不全の結果を示唆する線維化変化は認められな

かった。

今年度は、昨年度までに見出した MON の腎毒性について、40 mg/kg 体重の MON 単回投与後の遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析によってその発現機序を検討した。免疫組織化学的解析の結果、壊死した尿細管における尿細管再生に不可欠な IV 型 collagen の基底膜の免疫反応性は、MON の単回投与後も保持されていた。この再生能力の主要な決定因子は、尿細管基底膜の維持であり、これは低灌流由来の虚血性傷害後よりも、毒性由来の傷害後の方で保持され易いことが知られている (Breshears and Confer, 2016)。これらの所見から、マウスに MON を反復投与した後の近位尿細管再生は、代謝活性化により誘発された MON 毒性により、反復投与初期に急性尿細管壊死が生じた後遺症である可能性が示唆された。

MON 投与から 6 時間後の腎臓における遺伝子発現解析では、*Cyp3a13*、*Cyp26b1*、*Cyp4f15* などの代謝反応に関連する遺伝子や酸化ストレスに関連する *Gpx7* が発現増加を示した。シトクロム P450 (CYP) は様々なカビ毒の生体内変換に寄与することが知られている。カビ毒とその代謝物が細胞内に蓄積すると酸化ストレスが生じ、多くの重要な細胞プロセスに影響を及ぼす (Wen et al., 2016)。マウス肝臓では、CYP3A13 はアフラトキシン B₁ の生物活性化を触媒する重要な酵素であり、反応性で求電子性のエキソアフラトキシン B₁-8,9-エポキシドを生成する (Yanagimoto et al., 1994)。CYP26B₁ はオールトランス-レチノイン酸のクリアランスに関与し (Isoherranen and Zhong, 2019)、CYP4F15 はアラキドン酸カスケードにおいて重要な CYP4F サブファミリーのメンバーである (Kalsotra and Strobel, 2006)。*Gpx7* にコードされるグルタチオンペルオキシダーゼ 7 は、様々なストレスに応答してジスルフ

イド結合をシャットリングすることにより、その相互作用タンパク質にシグナルを伝達するストレスセンサー／伝達物質として機能する（Chen et al., 2016）。MON の代謝に関与する CYP はまだ特定されていないが、腎尿細管で MON が代謝される際に生成される活性中間代謝物や活性酸素種による毒性が、MON 投与により誘発される近位尿細管壊死の原因である可能性がある。また、昨年実施した 28 日間の試験では、40 mg/kg 体重 MON/日を投与したマウスで、肝臓の絶対重量の増加とともに、中心小葉肝細胞の肥大が観察された。多くの有害物質は、数日間の連続投与により、肝臓のミクロソームで CYP を含む代謝酵素の産生を誘導することが知られている（Amacher et al., 1998）。したがって、経口投与された MON は、肝細胞だけでなく、近位尿細管上皮細胞でも代謝される可能性があり、活性中間体や活性酸素種が尿細管毒性を引き起こすかもしれない。

E. 結論

MON を 40 mg/kg 体重 単回投与した後の腎皮質における網羅的遺伝子発現解析により、代謝反応関連遺伝子、及び酸化ストレス関連遺伝子の発現上昇が明らかになった。IV 型 collagen に対する免疫組織化学的解析の結果、MON 投与による壊死尿細管において基底膜の保持が確認された。これらの結果から、

MON がマウスの腎臓を標的とし、経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ojira, R., Zou, X., Yamagata, H., Ebizuka, Y., Kobayashi, M., Kigata, T., Tang, Q., Yoshida, T., Tomoya Yoshinari, T., Shibutani, M.: Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necrosis after oral exposure in mice. Food Chem. Toxicol. 19:115336, 2025.

2. 学会発表

該当なし

H. 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

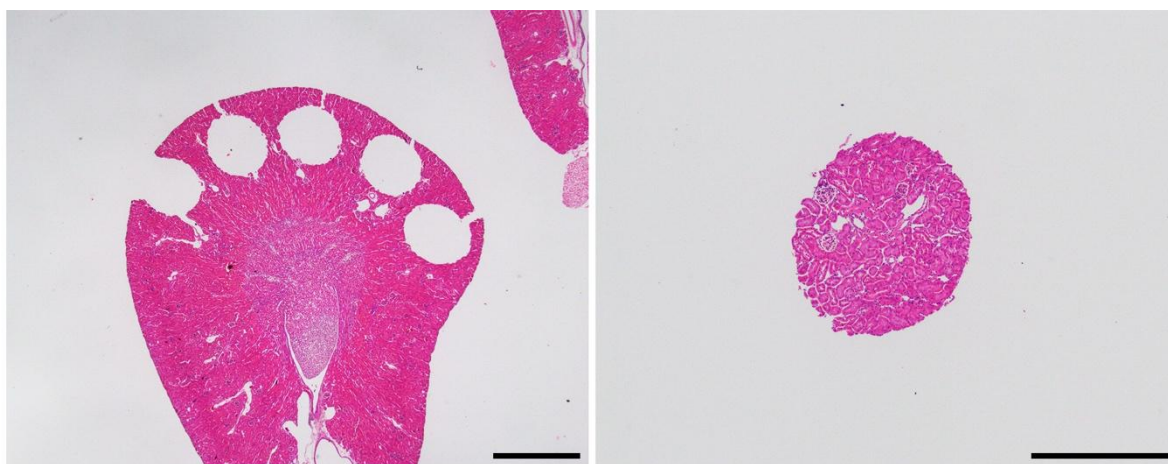


Fig. 1

ヘマトキシリン・エオジンで染色した解剖後の腎臓。遺伝子発現解析のための腎皮質のサンプリングは、パンチ生検器具装置を用いて行った。

左図: 拡大率 $\times 12.5$ (bar = 1 mm)。右図: 拡大率 $\times 40$ (bar = 500 μm)

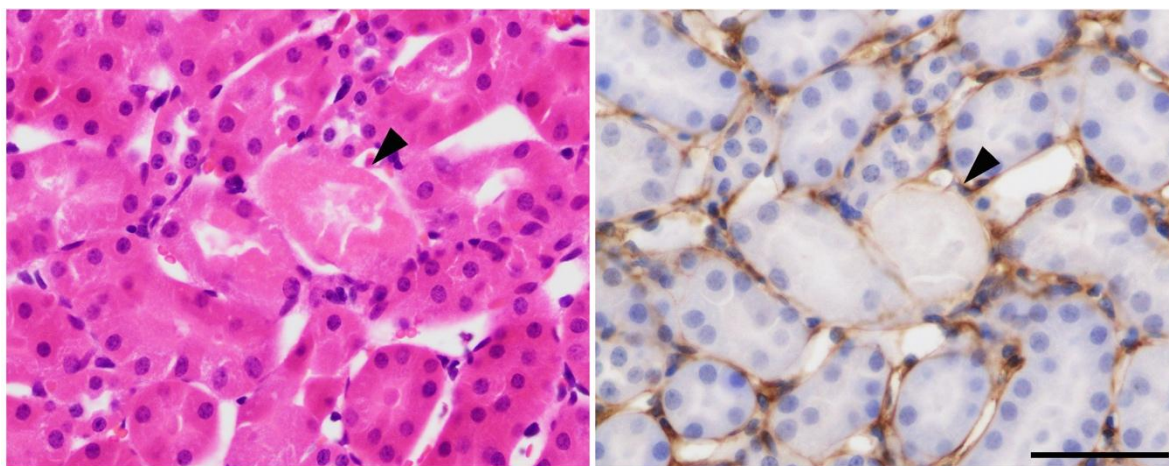


Fig. 2

MON を単回経口投与したマウス腎臓の壊死を示す尿細管の代表的な画像。左のパネル：ヘマトキシリン・エオジン染色、右パネル：コラーゲン 4 の免疫反応性。矢印は壊死した尿細管を示す。拡大率 $\times 400$ (バー = $50\mu\text{m}$)

Table 1

CD1(ICR)雄マウスに MON を単回経口投与した後の腎臓重量

After dosing	Vehicle controls			MON-treatment groups					
	6 h			6 h			24 h		
No. of animals examined	6			6			6		
Kidney weight ^a (g)	0.45	±	0.05	0.43	±	0.04	0.47	±	0.03

MON : moniliformin.

^a Mean ± SD.

Table 2

MON 単回経口投与後の CD1(ICR)雄マウスの腎臓において、発現量が増加した代謝反応に関連した遺伝子のリスト

Gene symbol	Description	log ₂ (fold-change)	P-value
Response to external stimulus			
<i>Ces1g</i>	Carboxylesterase 1G	2.406	< 0.001
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>Plxna3</i>	Plexin A3	2.497	0.001
<i>Ren1</i>	Renin 1 structural	2.924	< 0.001
<i>Rest</i>	RE1-silencing transcription factor	2.709	< 0.001
Cell migration			
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	2.311	< 0.001
<i>Plxna3</i>	Plexin A3	2.497	0.001
<i>Rnd1</i>	Rho family GTPase 1	4.227	< 0.001
Regulation of immune system process			
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>P4htm</i>	Prolyl 4-hydroxylase, transmembrane (endoplasmic reticulum)	2.497	0.002
<i>Tnfrsf13b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	2.215	0.025
Lipid binding			
<i>Cyp4f15</i>	Cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15	2.311	0.007
Retinoid metabolic process, diterpenoid metabolic process, terpenoid metabolic process			
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>Cyp3a13</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	2.469	< 0.001
<i>Ttr</i>	Transthyretin	34.555	< 0.001
Steroid metabolic process			
<i>Ces1g</i>	Carboxylesterase 1G	2.406	< 0.001
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>Cyp3a13</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	2.469	< 0.001
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	2.311	< 0.001
<i>Hsd17b14</i>	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	4.663	< 0.001
<i>Rest</i>	RE1-silencing transcription factor	2.709	< 0.001
Identical protein binding			
<i>Apobec2</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2	7.384	< 0.001
Extracellular region			
<i>Gpx7</i>	Glutathione peroxidase 7	2.037	0.008